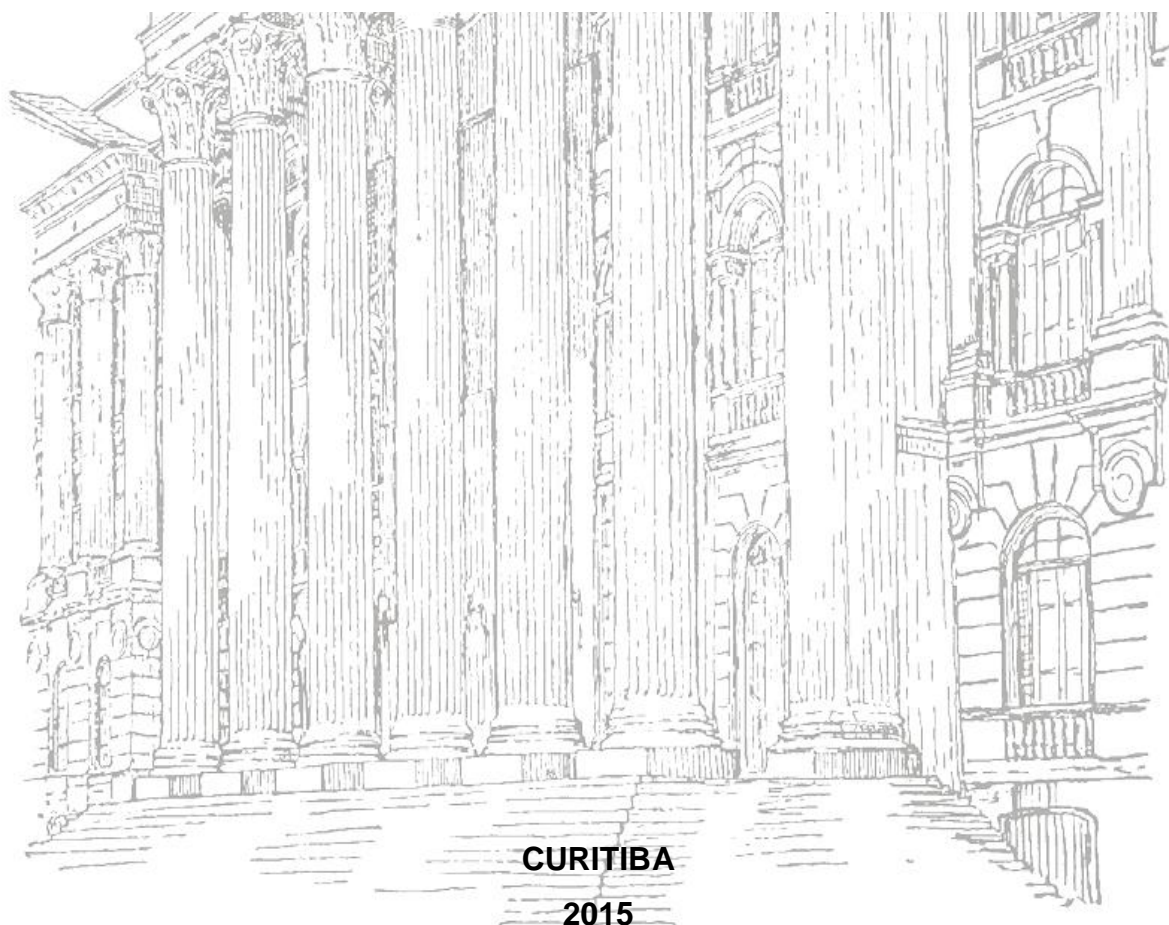


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA PEROTTONI



**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA
COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO CONTRA *Corynebacterium diphtheriae*
Kruse, 1886**



**CURITIBA
2015**

CAROLINA PEROTTONI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA
COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO CONTRA *Corynebacterium diphtheriae*
Kruse, 1886**

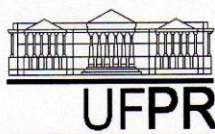
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos treze dias do mês de Fevereiro de 2015, na Sala de Aulas do prédio CENBAPAR, do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof. Dr. Júlio César de Carvalho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Quinta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (UFPR), Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Dra. Viviane Monteiro Goes (IBMP), e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação).

Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Carolina Perottoni** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO CONTRA *Corynebacterium diphtheriae* Kruse, 1886**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Dra. Viviane Monteiro Goes, e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 13 de Fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Profa. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe

Dra. Viviane Monteiro Goes

Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos e Maria Luzia que sempre me fizeram acreditar em mim mesma e na realização dos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol, professor Visitante e Orientador do núcleo permanente do Programa de Mestrado e de Doutorado em Processos Biotecnológicos, orientadora desta dissertação, por seu constante estímulo, paciência, apoio e orientação. Com a Professora, aprendi muito e estas lições levarei para a vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade oferecida e pela contínua luta pela excelência da ciência em nosso país.

Aos meus pais e a meu irmão, por todo o suporte, compreensão, paciência e por me acompanhar e acreditar em mim durante toda esta jornada.

À Diretoria Executiva do Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, por acreditar em meu potencial, concedendo a oportunidade de desenvolver este projeto dentro de suas instalações da instituição e fornecendo as condições necessárias.

À minha amiga e colega de trabalho, Thaísa Scheuer presente em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sempre auxiliando, aconselhando e levando as situações com desembaraço que nos fizeram chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Odir Delagostin, da Universidade Federal de Pelotas, por nos ceder o vetor pAE, e juntamente com a Prof.^a Dr.^a Sibele Borsuk e todos os professores e colegas do Curso de Vacinologia Reversa II, pelos conhecimentos adquiridos.

Ao colega de trabalho Osvaldo Schreder Junior, por nos ceder a cepa de *C. diphtheriae* e orientações, indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À Silvana Maria Alban, Mitiyo Miyaoka, Gilberto Delinski e Ludmilla Troiano Della Coletta pela disponibilidade, protocolos e explicações.

À Taís Canova e Cristiane Marco da Universidade Positivo, pela disponibilidade e auxílio.

A todos os colegas de pós-graduação: Denise Salmon, Felipe Brisk, Alfredo Walter, Sidnei Bordignon, Carlos Sanchuki, Siliane Berté, Mário Bier, Júlio Frison e Ricardo Cancio Frendrich pelo apoio e momentos de descontração.

Ao Professor Emanuel Maltempi e Caroline Kukolj pela realização da análise da proteína por MALDI-TOF.

À todos os colegas do Laboratório de Química Fina, Controle de Qualidade, e Laboratório de Antígenos Veterinários do Tecpar, por todo suporte e reagentes, em especial Marcelo Ribani, Adriana Fontana de Mattos, Jairo Luiz Labiak, Rubens Chaguri, Gilberto Delinski Jr. e Luciana Requião.

À todos os colegas do Laboratório de Produtos Bacterianos de Uso Humano e da Garantia da Qualidade, em especial Andréa Muggiati de Abreu, Elder Ribeiro, Antônio Carlos de Souza e Alana Mariele Rodrigues Galdino.

Aos meus primos queridos Alexandre Tazoniero, Priscilla Tazoniero e Rafael Silveira pelo incentivo durante a elaboração desta dissertação, e em especial à Stefanía Svala Óskarsdóttir e Marília Caputo que providenciaram as condições necessárias para tal.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma proteína recombinante com potencial imunogênico contra *Corynebacterium diphtheriae*, que possa ser utilizada como vacina de subunidade. A cepa de *C. diphtheriae* foi utilizada para clonagem do gene da subunidade B da toxina por ser a porção imunogênica da molécula. O produto da clonagem foi inserido no vetor de expressão pAE, e amplificado em *Escherichia coli* DH5 alfa. Para a expressão da proteína, o plasmídeo contendo o inserto foi transfectado em *E. coli* BL21 pLysS. As melhores condições de expressão da proteína recombinante foram 31°C, 0,3 mM de indutor (IPTG) e 3 horas de indução, sendo significativo somente para a fração solúvel da proteína. A proteína foi purificada em coluna de afinidade de níquel. As endotoxinas foram removidas com triton X114, sem perda significativa da proteína durante o processo (380 µg/mL). A taxa de recuperação foi de 33% e o rendimento final foi de 348 µg/mL. A proteína foi sequenciada com 99% de similaridade com a subunidade B da toxina diftérica, apresentando-se como antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra a difteria.

Palavras-chaves: *Corynebacterium diphtheriae*, Difteria, Toxina Diftérica Subunidade B, Vacina de Subunidade.

ABSTRACT

The aims of this work was to produce a recombinant protein with immunogenic potencial against *Corynebacterium diphtheriae*, which can be used as a subunit vaccine. The *C. diphtheriae* was used for cloning the B subunit of the diphtheria toxin gene, as it is the immunogenic portion of the molecule. The PCR product was inserted into the cloning vector pAE and amplified in *Escherichia coli* DH5alpha. To the protein expression, the plasmid containing the insert was trasnfected into *E. coli* BL21 pLysS. The best culture conditions were 31°C, IPTG 0.3 mM e 3 hours of induction, being significant only to the soluble fraction. The protein was purified by nickel affinity column and endotoxins were removed with Triton X-114, with no significant protein loss (380 µg/mL). The recovery rate was 33% with the final yield of 348 µg/mL. The protein was sequenced and showed 99% of similarity to the diphtheria toxin B subunit. The heterologous protein, here produced, is a promising antigen for a vaccine production against the diphtheria disease.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, Diphtheria, Diphtheria Toxin, Diphtheria Toxin Subunit B, Subunit Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DE <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CORADO COM AZUL DE METILENO.	22
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA TOXINA DIFTÉRICA.	23
FIGURA 3 – PRODUÇÃO DA TOXINA DIFTÉRICA EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA.	24
FIGURA 4 – (A) LESÃO DE PELE. (B) PSEUDOMEMBRANA EM NASOFARINGE. (C) PACIENTE COM GÂNGLIOS ENFARTADOS.	26
FIGURA 5 – TOTAL DE CASOS DE DIFTERIA x COBERTURA VACINAL DE 1980 A 2006.	28
FIGURA 6 – CASOS DE DIFTERIA NO CONTINENTE AMERICANO NOS ÚLTIMOS 10 ANOS.....	29
FIGURA 7 – ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DE <i>C. diphtheriae</i>	37
FIGURA 8 – ETAPAS DO PROCESSO DE CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA.....	38
FIGURA 9 – DESENHO DO VETOR pAE.	41
FIGURA 10 – O VETOR pAE COM O INSERTO DIFB.	42
FIGURA 11 – ETAPAS DA PRODUÇÃO DAS CÉLULAS RECOMBINANTES.....	46
FIGURA 12 – ETAPAS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	56
FIGURA 13 – FOTOMICROGRAFIA DO CULTIVO DE <i>C. diphtheriae</i>	61
FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DA EXTRAÇÃO DO DNA DO <i>C. diphtheriae</i>	62
FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR. A SETA INDICADA O FRAGMENTO CLONADO POR PCR.	63
FIGURA 16 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO SCREENING DAS COLÔNIAS COM O PLASMÍDEO INSERIDO. A SETA INDICA A PRESENÇA DE PLASMÍDEO.....	64

FIGURA 17– ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PLASMÍDEO PAE EXTRAÍDO DO CULTIVO DE <i>E.coli</i> DH5alfa..	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 18 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pAE COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.	65
FIGURA 19 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA DIGESTÃO DO GENE DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA PELAS ENZIMAS <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.	65
FIGURA 20 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO SCREENING DAS COLÔNIAS APÓS TRANSFORMAÇÃO.....	66	
FIGURA 21 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA DUPLA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO COM AS ENZIMAS <i>Bam</i> HI E <i>Hind</i> III EXTRAÍDO E PURIFICADO DAS COLONIAS OBTIDAS NO SCREENING DA TRANSFEÇÃO.....	67	
FIGURA 22 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.	68
FIGURA 23 – GEL SDS-PAGE DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	69	
FIGURA 24 – WESTERN BLOT DA FRAÇÃO INSOLÚVEL CONTRA ANTICORPOS ANTI-HIS 6.	70
FIGURA 25 – CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>E.coli</i> BL 21 TRANSFECTADA (CONCENTRAÇÃO CELULAR (g/L) X TEMPO (h)).	71
FIGURA 26 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DA <i>E.coli</i> BL 21 TRANSFORMADAS.	72
FIGURA 27 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INDUÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	73	
FIGURA 28 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (37kDa).....	74	
FIGURA 29 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	74	
FIGURA 30 – DIAGRAMA DE PARETO COM AS CONDIÇÕES DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO SOLÚVEL.	76

FIGURA 31 – GRÁFICO DE CONTORNOS DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO SOLÚVEL.....	77
FIGURA 32 – DIAGRAMA DE PARETO COM AS CONDIÇÕES DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO INSOLÚVEL.....	78
FIGURA 33 – ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DO CULTIVO DA <i>E. coli</i> BL21 RECOMBINANTE APÓS IMPULSOS DE SONICAÇÃO.....	79
FIGURA 34 - ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EM COLUNA HIS Trap FF.....	80

LISTA DE TABELA

TABELA 1- VACINAS PRESENTES NAS CAMPANHAS DE VACINAÇÃO MUNDIAL.....	34
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS CADEIA B DA TOXINA DIFTÉRICA, COM OS AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTES.....	44
TABELA 3 - REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	48
TABELA 4 - FATORES E NÍVEIS ESTUDADOS EM OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA.....	53
TABELA 5 – ETAPAS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	58
TABELA 6 – TABELA DA ABSORBANCIA, CONCENTRAÇÃO E PUREZA DE DNA.....	62
TABELA 7 –PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE IPTG, TEMPERATURA E TEMPO DE INDUÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	75
TABELA 8 –ANOVA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO SOLÚVEL.....	76
TABELA 9 - TABELA ANOVA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO INSOLÚVEL.....	79
TABELA 10 – FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE DO CULTIVO SONICADO EM TAMPÃO DE RESUSPENSÃO.....	81
TABELA 11– SEQUENCIA OBTIDA DO PLASMÍDEO COM O INSERTO.....	82
TABELA 12 - CORRESPONDENCIAS DA SEQUENCIA OBTIDA NA ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	83

LISTA DE ABREVIATÖES

% – porcentagem

°C – graus Celsius

Abs – unidade de absorbância

bp – par de base

C. diphtheriae - *Corynebacterium diphtheriae*

CDC – *Center for Disease Control*

cm – centímetros

DTP – Vacina Tríplice Bacteriana, contra Difteria, Tétano e Pertussis.

DTPa – Vacina Tríplice Bacteriana, contra Difteria, Tétano e Pertussis acelular.

dTPa – Vacina Tríplice Bacteriana, contra Difteria (componente purificado), Tétano e Pertussis acelular.

DT – Vacina Dupla Bacteriana, contra Tétano e Difteria.

dT – Vacina Dupla Bacteriana, contra Tétano e Difteria (componente purificado).

ELISA – ensaio imunosorbente ligado à enzima

g – grama (unidade de massa)

h – hora

IPTG – tiogalactopiranosídeo de isopropila

kDa – kilodalton

L – litro

LB – Luria-Bertani

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

Mr – Massa molecular nominal

ng – nanograma

nL – nanolitro

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR – reação de polimerase em cadeia

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

UNICEF – *United Nations Children's Found* - Fundo das nações unidas para a infância

V – volts

WHO – World Health Organization

wP – *whole cell Pertussis*

xg – gravidade

μ – velocidade específica de crescimento

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	20
3.2. PATÓGENO.....	21
3.3 TOXINA	22
3.4 DOENÇA	27
3.5 VACINAS	30
3.6 VACINAÇÃO.....	31
3.7 RISCOS VACINAIS.....	35
3.8 EPIDEMIOLOGIA	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA POR PCR	38
4.1.1 CULTIVO DO <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	38
4.1.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA DO MICRORGANISMO	40
4.1.3 CLONAGEM POR PCR DA SUBUNIDADE B PARA TRANSFEÇÃO	41
4.2 TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS	45
4.2.1 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES <i>E. coli</i> DH5alpha™ e BL21 pLysS™	45
4.2.2 PREPARO DO PLASMÍDEO	47
4.2.3 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PLASMÍDEO E O INSERTO.....	48
4.2.4 CLONAGEM DO PLASMÍDEO pAE LIGADO A SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA.....	49

4.2.5 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	50
4.2.5.1 CULTIVO DE <i>Escherichia coli</i> BL21 pLysS TRANSFORMADA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS	50
4.2.5.2 SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA	50
4.2.5.3 WESTERN BLOT COM ANTICORPO ANTI-HIS6.....	51
4.2.5.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E CRESCIMENTO CELULAR	52
4.2.5.5 OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	53
4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	54
4.3.1 CULTIVO DA <i>E. coli</i> BL21 TRANSFECTADA	55
4.3.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA - PRÉ-COLUNA	56
4.3.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	57
4.3.4 REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS COM TRITON X-114.....	58
4.3.5 DOSAGEM DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	59
4.4 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO COM INSERTO E DA PROTEÍNA DE INTERESSE	59
4.4.1 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL E INSERTO.....	59
4.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	59
5 RESULTADOS	61
5.1 CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA POR PCR	61
5.1.1 CULTIVO DO <i>C. diphtheriae</i> PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	61
5.2 TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS	63
5.2.1 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E PREPARO DO PLASMÍDEO	63
5.2.2 CLONAGEM DO PLASMÍDEO pAE LIGADO A SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA.....	66
5.2.3 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PLASMÍDEO E O INSERTO.....	67
5.2.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	68
5.2.4.1 CULTIVO DE <i>E. coli</i> BL21 TRANSFORMADA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	68
5.2.4.2 TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA.....	69
5.2.4.3 RECONHECIMENTO DA PROTEÍNA COM ANTICORPOS ANTI-HIS6	70
5.2.4.4 CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS	71
5.2.4.5 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	73

5.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	79
5.3.1 CULTIVO DA <i>E. coli</i> BL21 TRANSFECTADA, ETAPAS PRÉ-PURIFICAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	79
5.3.2 REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS COM TRITON X-114	81
5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL E DA PROTEÍNA DE INTERESSE	82
5.4.1 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DO GENE CLONADO POR PCR INSERIDO NO PLASMÍDEO pAE	82
5.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	82
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÃO	91
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	92
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A difteria é uma doença decorrente da infecção do trato respiratório superior por *Corynebacterium diphtheriae*. É específica de humanos e causa febre, dor de garganta e mal-estar. Uma membrana fibrosa cinza e espessa, denominada pseudomembrana, se forma sobre o local da infecção devido ao crescimento bacteriano. Esta mesma membrana produz a toxina que causa necrose do tecido subjacente e resposta imunitária do hospedeiro (MURPHY, 1996). A bactéria desenvolve-se na garganta e nas amígdalas. Em regiões tropicais pode ser encontrada em úlceras na pele. A doença pode agravar-se e resultar na mortalidade, principalmente em crianças, por obstrução das vias aéreas e danos aos tecidos. A toxina se espalha pela corrente sanguínea e ocasiona paralisia muscular, insuficiência cardíaca e renal e em casos extremos, a morte. Cerca de 5 a 10% das pessoas que desenvolvem difteria morrem da doença e cerca de 20% dos casos sofrem danos permanentes (MURPHY, 1996; CDC, 2011). No ano de 2000, em todo o mundo registrou-se 30.000 casos da doença com 3.000 mortes (WHO, 2013). Apesar de se tratar de uma doença imunoprevenível e das extensas campanhas de vacinação, ainda é um problema de saúde pública (MURPHY, 1996; MATTOS-GUARALDI, 2003; CDC, 2011). O alto grau de suscetibilidade das crianças faz com que a imunização artificial seja preconizada em idade precoce. A vacina atualmente utilizada na imunização em todo o mundo é produzida por cultivo do microrganismo, inativação e uma etapa de purificação. Desta forma, diversos antígenos inespecíficos causam reações adversas, porém não contribuem na imunidade. O toxóide inativado é administrado em duas ou três doses (com um mês de intervalo entre cada uma) sendo a imunização primária na idade de 3 a 4 meses de vida. A dose de reforço deve ser administrada cerca de um ano mais tarde e é aconselhável administrar várias doses de reforço durante a infância. As crianças de todo o mundo são imunizadas com a vacina trivalente bacteriana contendo o toxóide diftérico, o componente para coqueluche e toxóide tetânico (DTP) (WHO, 2013). No entanto, as vacinas atuais não proporcionam imunidade de longa duração. O título contra *C. diphtheriae* desaparece depois de alguns anos (± 10 anos) e doses de reforço não são administradas na população adulta devido aos efeitos colaterais (WHO, 2013).

Buscando a resolução desta falha vacinal, as vacinas de subunidade recombinantes apresentam-se como uma alternativa. Elas são capazes de induzir imunidade de longa duração, tem menor custo além de ter menor risco e efeitos colaterais. Mundialmente, para a difteria ainda não se atingiu este estágio de tecnologia, mas é uma alternativa desejável uma vez que o reforço poderia ser tomado em qualquer idade, sem restrições (OMS, 2013).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo produzir uma proteína recombinante da subunidade B da toxina diftérica com potencial imunogênico, eficaz e segura, para ser utilizada na formulação de uma vacina de subunidade, inovadora e com aplicação industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir proteína recombinante da subunidade B da toxina diftérica, com potencial imunogênico contra *C. diphtheriae*, viável industrialmente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Cultivar *C. diphtheriae* e clonar o gene da subunidade B da toxina diftérica por PCR.
- b) Inserir o produto clonado por PCR no plasmídeo pAE e transfectar o plasmídeo ligado ao inserto em *E. coli*.
- c) Confirmar a identidade da subunidade B por sequenciamento do plasmídeo ligado ao inserto.
- d) Induzir a expressão da proteína recombinante em fermentação líquida em Erlenmeyer.
- e) Testar as diferentes condições de expressão da proteína como concentração do agente indutor, temperatura e tempo de indução.
- f) Purificar a proteína recombinante por cromatografia líquida com coluna de níquel.
- g) Remover as endotoxinas do produto pós-purificação.
- h) Confirmar a identidade da proteína por SDS-PAGE, *Western Blot* e MALDI-TOF.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Ao longo da história, a difteria foi uma das principais causas de morte entre crianças e foi muitas vezes confundida com escarlatina, pois são doenças difíceis de distinguir.

A doença era conhecida por uma variedade de nomes, tais como doenças da garganta, cinomose da garganta, dor de garganta, crupe maligno, angina sufocante, ferida gangrenosa na garganta, dor de cancro, amidalite maligna, dor de garganta maligna ou pestilenta, angina maligna, "anjo estrangulador das crianças", "Garrotilhos", entre outros (RAPPUOLI, 2011). No século IV A.C. Hipócrates descreveu sintomas de asfixia e evolução clínica de uma doença, que poderia se tratar da difteria.

Visando contribuir com o conhecimento da doença serão apresentados os principais aspectos históricos por ano.

Em 1613, na Espanha, houve uma epidemia de difteria, o ano foi nominando como "El Año de los Garrotillos" ("estrangulamentos"), por causa de muitas mortes por asfixia (LAVAL, 2006).

Em 1735, houve uma epidemia em *New England*, EUA.

Em 1746, a difteria estava disseminada na França, fato que deixou a doença conhecida na Inglaterra como "dor de garganta de Boulogne" (LAVAL, 2006).

Em 1826, Pierre Philippe Bretonneau descreveu a doença como uma membrana resistente que se forma na garganta e nomeou pela primeira vez a doença como difteria.

Em 1883, Klebs demonstrou que o *C. diphtheriae* é o agente da difteria.

Em 1884, Loëffler descobriu que o organismo só pode ser cultivado a partir da cavidade nasofaríngea e postulou que os danos aos órgãos internos eram resultantes de uma toxina solúvel (MURPHY, 1996).

Em 1888, Roux e Yersin descobriram a toxina diftérica e demonstraram que os animais injetados com filtrados estéreis de *C. diphtheriae* desenvolviam patologia

nos órgãos, indistinguível da difteria humana. Este fato demonstrou que uma exotoxina potente é o principal fator de virulência da doença (PAPPENHEIMER, 1984; MURPHY, 1996).

Em 1890, a antitoxina contra a difteria foi desenvolvida por Shibasaburo Kitasato e Emil Von Behring (MURPHY, 1996).

Em 1920, a primeira vacina foi desenvolvida (MURPHY, 1996).

Em 1923, Gaston Ramon, veterinário do Instituto Pasteur na França, desenvolveu o toxóide diftérico (MURPHY, 1996).

Com o desenvolvimento e administração da vacina contra a difteria na população mundial, a incidência da doença diminuiu significativamente, mas ainda é um desafio para a manutenção da baixa incidência da doença (WHO, 2013).

3.2. PATÓGENO

O *Corynebacterium diphtheriae* é um bacilo gram positivo, não esporulado, não encapsulado, não móvel, conhecido também como bacilo Klebs-Löffler, por ter sido descoberto por estes dois bacteriologistas. O *Corynebacteria* é classificado como actinobactéria e está filogeneticamente relacionado com micobactérias e actinomicetos. Pertence ao:

Reino: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Ordem: Actinomycetales

Subordem: Corynebacterineae

Família: Corynebacteriaceae

Gênero: *Corynebacterium*

Espécie: *C. diphtheriae*

A morfologia de *C. diphtheriae* é representada na FIGURA 1. Uma característica dos bacilos é ficarem arranjados como letras chinesas ou em paliçadas devido aos movimentos logo após a divisão celular (TODAR, 2009).

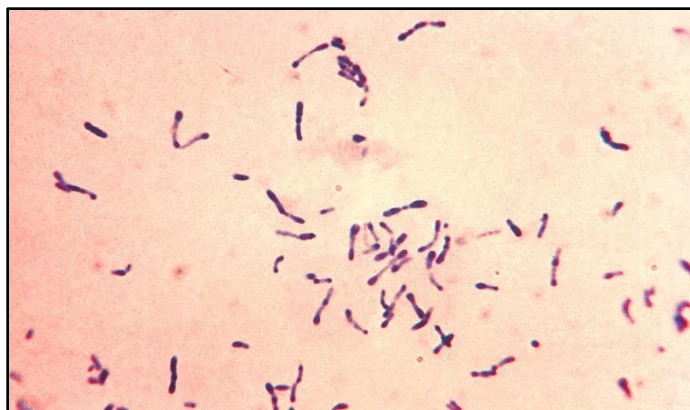


FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DE *Corynebacterium diphtheriae* CORADO COM AZUL DE METILENO.

FONTE: CDC – Centers for disease control and prevention's public health image library (Phil), com identificação número #7323 (2014).

3.3 TOXINA

A patogenicidade *C. diphtheriae* é devida à infecção do bacilo por um bacteriófago, tornando a cepa lisogênica. Na sua forma original a bactéria não apresenta patogenia. O bacteriófago transporta a informação genética de uma toxina, o gene *Tox*, que é uma sequência altamente conservada e codificada pelo cromossomo bacteriano (GROMAN *et al.*, 1955; BONNET *et al.*, 1999; BUZZI *et al.*, 2006). O gene estrutural da toxina diftérica (DT) contém 535 resíduos de aminoácidos, que codificam uma proteína de 58 kDa. A proteína é composta por duas cadeias polipeptídicas, fragmentos A e B conectados por uma ligação dissulfeto (GÓMEZ-DUARTE, 1995, MURPHY, 1996; BONNET *et al.*, 1999).

A toxina é sintetizada como uma cadeia polipeptídica simples, no interior do microrganismo e secretada para o meio extracelular. Fora da célula hospedeira, a toxina é inativa. A subunidade B, não tóxica e de massa molecular nominal (*Mr*) de 37.195, é a subunidade de reconhecimento responsável pela internalização da toxina na célula hospedeira. Estudos indicam esta subunidade como responsável pelo desenvolvimento de imunogenicidade contra o *C. diphtheriae*. A entrada da toxina se faz por meio da ligação ao receptor de fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF) na superfície da célula. Esse receptor é um membro da superfamília de fatores de crescimento. Esta ligação faz com que a célula internalize

a toxina para o interior de endossomos (PAPPENHEIMER, 1977). Dentro do endossomo, a toxina é clivada pela protease tripsina, destacando o fragmento A, altamente tóxico, da porção N terminal da cadeia polipeptídica, resultando nos seus fragmentos individuais A e B (PAPPENHEIMER, 1977). Na FIGURA 2, está representada a toxina diftérica. A subunidade A está indicada na porção esquerda da figura e a subunidade B, na porção direita. Entre elas, indicada pela seta, está a ligação dissulfeto ligando as subunidades. A acidez do ambiente faz com que o fragmento B crie poros na membrana do endossomo, realizando a liberação da subunidade A para o citoplasma da célula. Neste ponto, o fragmento A (Mr 21.167) é capaz de catalisar a ribosilação do ADP do fator de alongamento 2 (eEF2) na tradução de proteínas na maioria das células eucarióticas. A ADP-ribosilação envolve a transferência de um ADP-ribose de um NAD⁺ para a diftamida da proteína EF-2, a qual é necessária para o movimento do RNAt do sítio A ao P do ribossoma durante a tradução de proteínas. A ADP-ribosilação impede a síntese de proteínas (GROMAN, 1955; CIEPLAKS *et al.*, 1987; ABDEL-FATTAH, 2013).

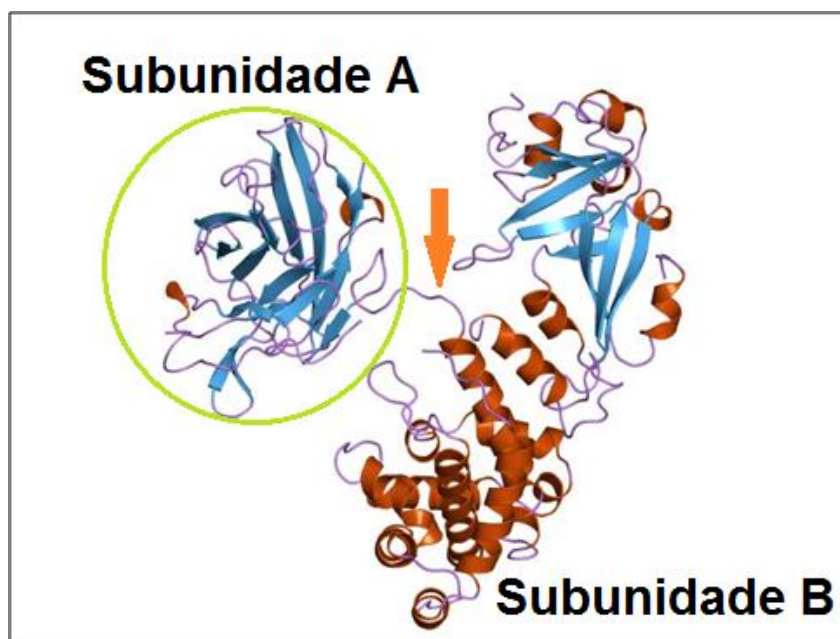


FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA TOXINA DIFTÉRICA.

FONTE: Jawahar Swaminathan and MSD staff at the European Bioinformatics Institute –Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/1xdt600.png> e <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1xdt/summary> (2014).

Esse mecanismo torna impossível a manutenção do metabolismo celular e resulta na morte celular (FIGURA 3) (ZDANOVSKY *et al.*, 1992). A toxina produz

necrose local do tecido e quando absorvida pela corrente sanguínea, causa toxemia, complicações sistêmicas e insuficiência cardíaca. A principal complicação sistêmica é a paralisia por consequência da neurite periférica desmielinizante. Já a insuficiência cardíaca é devida miocardite (BONNET *et al.*, 1999; OMS, 2006).

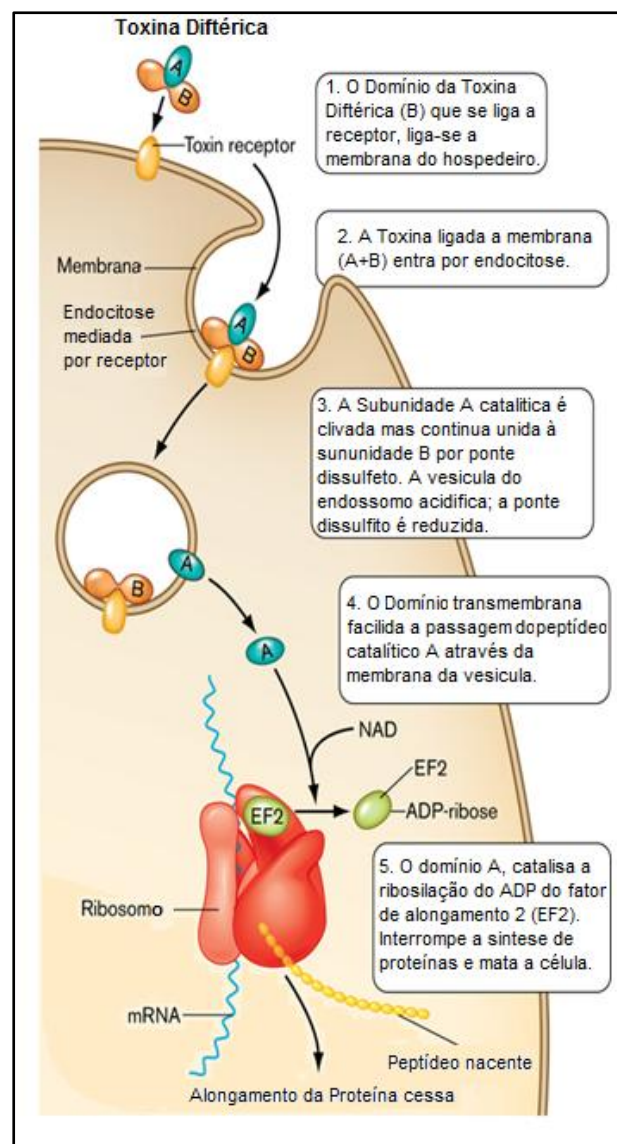


FIGURA 3 – PRODUÇÃO DA TOXINA DIFTÉRICA EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA.

LEGENDA: A – SUBUNIDADE A DA TOXINA DIFTÉRICA, B – SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA, MRNA – RNA MENSAGMEIRO, EF2 – FATOR DE ALONGAMENTO NA TRANSCRIÇÃO DE PROTEÍNAS, NAD – NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO, ADP – ADENOSINA DIFOSFATO RÍBOSE.

FONTE: http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/img/etopics/sfmb2e_etopic_2502_3.jpg. (2014).

São conhecidos quatro biótipos de *C. diphtheriae*, classificados de acordo com a morfologia da colônia e propriedades bioquímicas: *mitis*, *intermedius*, *gravis* e *belfanti*, assim como seus lisotipos, conforme a sensibilidade do corynebacteriófago

(MURPHY 1996). A maioria das infecções têm sido causada pelos biótipos *gravis* e *mitis*, apesar de o tratamento e o bloqueio sanitário serem idênticos para todas as cepas toxigênicas (BONNET *et al.*, 1999).

3.4 DOENÇA

Existem dois tipos de manifestações clínicas da difteria: a cutânea e a nasofaríngea. A forma cutânea, mais rara, é caracterizada por lesões na pele cobertas por uma pseudomembrana cinza-marrom (FIGURA 4A). As lesões começam como vesículas e formam úlceras pequenas, demarcadas, e por vezes múltiplas. Aparecem nas partes expostas, especialmente nas pernas (MURPHY, 1996; BONNET *et al.*, 1999; CDC, 2012). A difteria faríngea se caracteriza por faringite leve, mas pode evoluir para hipóxia por obstrução das vias aéreas. A evolução da pseudomembrana resulta na reação inflamatória responsável pelo edema e obstrução (FIGURA 4B). Embora nem sempre presente, a pseudomembrana é cinza, grossa, fibrosa, e firmemente aderida. Quando deslocada, a membrana libera grande quantidade de toxina, e por esta razão, não é aconselhável sua remoção. Há um aumento progressivo da rouquidão e estridor quando a infecção atinge a faringe. Pode causar secreção nasal sanguinolenta. Outra característica da evolução da doença é o inchaço no pescoço, devido ao edema dos nódulos linfáticos (FIGURA 4C) (MURPHY, 1996; BONNET *et al.*, 1999; OMS, 2006). Complicações com risco de morte podem ocorrer por perda da função motora (causando dificuldade de deglutir) e insuficiência cardíaca congestiva (que acomete cerca de 20% dos casos). As complicações são devidas à ação da toxina diftérica em neurônios motores periféricos e no miocárdio (MURPHY, 1996). Por ser contagiosa, a forma de propagação da doença se dá pelo contato físico direto ou por secreções de pessoas infectadas.

A difteria não é facilmente diagnosticada em bases clínicas. Os casos leves da doença se assemelham a faringite estreptocócica e a pseudomembrana clássica pode não se desenvolver, particularmente em pessoas que tenham sido vacinadas. Nem todos os laboratórios de diagnóstico rotineiramente realizam o cultivo bacteriano para *C. diphtheriae*, o que pode gerar falha ou atraso no diagnóstico (BONNET *et al.*, 1999; BRYAD, 2013).

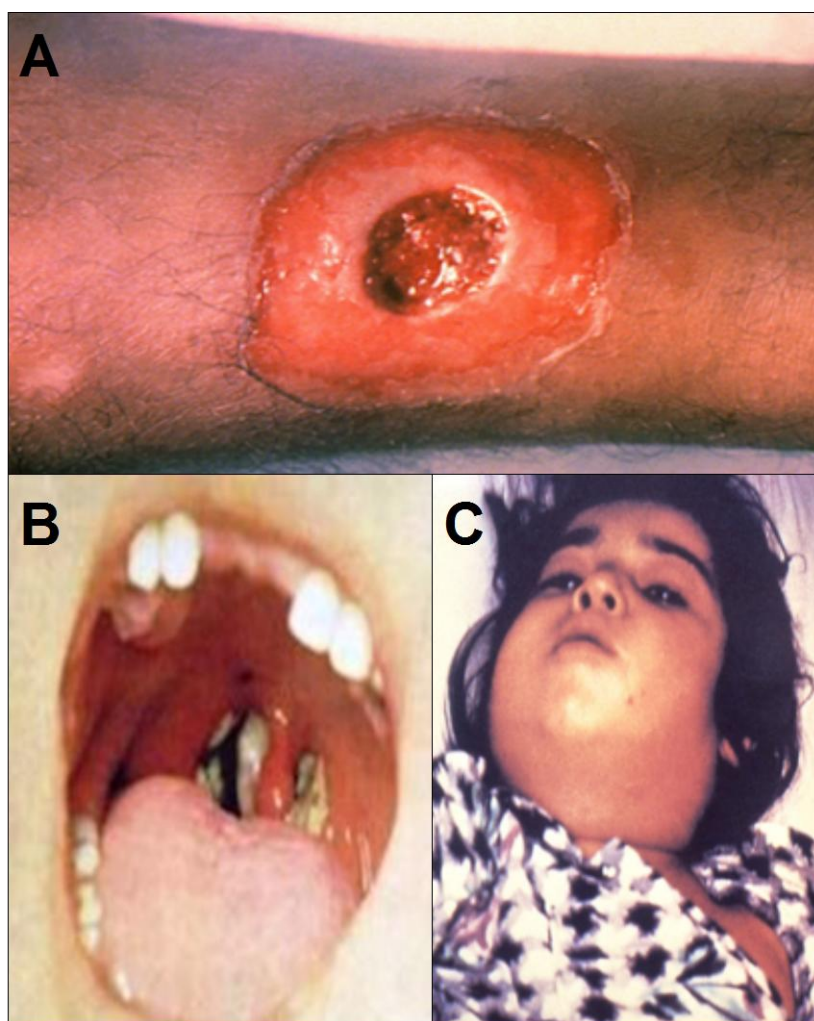


FIGURA 4 – (A) LESÃO DE PELE. (B) PSEUDOMEMBRANA EM NASOFARINGE. (C) PACIENTE COM GÂNGLIOS ENFARTADOS.

FONTE: (A,C) CDC - Centers for disease control and prevention's public health image library (Phil), com identificação número #1941 e #5325 (2014). (B) Disponível em: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1981> (2014).

3.5 SINTOMAS DA DIFTERIA

A forma respiratória da doença tem um período de incubação de dois a cinco dias. O início da doença é gradual e os sintomas incluem febre, fadiga, garganta sensível e dificuldade para deglutição. As crianças infectadas são acometidas de náuseas, vômitos, calafrios e febre alta, embora algumas não apresentem sintomas até a progressão da doença. Em cerca de 10% dos casos, os pacientes apresentam

edema no pescoço e estes casos estão associados a risco de morte (BONNET *et al.*, 1999; BRYAD, 2013). Além dos sintomas nos locais da infecção, o paciente pode apresentar sinais inespecíficos como apatia, palidez e ritmo cardíaco acelerado, causados pela toxina diftérica (BONNET *et al.*, 1999).

A difteria cutânea é uma forma secundária, resultante de uma doença de pele pré-existente e pode aparecer em média sete dias após a lesão cutânea primária (BONNET *et al.*, 1999).

3.6 EPIDEMIOLOGIA

A difteria ocorre em todo o mundo, embora não seja comum em países industrializados pelo uso rotineiro e de longa data da vacina (DTP). Porém, grandes epidemias foram registrados em vários países da Europa Oriental na década de 1990, e casos ainda são relatados até mesmo nos países desenvolvidos (CDC, 1998; OMS, 2013). Focos da doença após a dissolução da antiga União Soviética surgiram no final da década de 1980, pela queda da taxa de vacinação, causando um aumento significativo nos casos de difteria. Em 1991, havia 2.000 casos na URSS. Em 1998, segundo estimativas da Cruz Vermelha, havia cerca de 200.000 casos na Comunidade de Estados Independentes da Ex-URSS, com 5.000 mortes (KADIROVA *et al.*, 1995; TODAR, 2009).

A taxa de letalidade da difteria não mudou nos últimos 50 anos. A taxa global de mortalidade é de 5 a 10%, sendo maior entre crianças com idade inferior a 5 anos e adultos com mais de 40 anos (até 20%). Na era pré-vacinal, a doença era fatal em até 50% dos casos (TODAR, 2009).

Em 2011, segundo a OMS, somaram-se 4.887 casos notificados em todo o mundo. No mesmo ano, no sul da França, foi registrado um caso em um homem de 40 anos pela perda de imunidade vacinal (ROUSSEAU *et al.*, 2011). Houve um crescimento de casos nos anos 90 em adolescentes e adultos não vacinados ou inadequadamente imunizados (CDC, 1998).

A reincidência da doença ocorre quando um dos fatores de controle é desestabilizado (FIGURA 5). Pesquisas são realizadas nos casos registrados de

difteria para tentar entender as falhas na erradicação da doença. Estas apontam como principais fatores da reincidência a cobertura vacinal insuficiente, a interrupção do calendário de vacinação e o reforço não eficaz após as doses primárias na infância (KJELDSEN *et al.*, 1985; RAPPUOLI, 1993; MAPLE, 2001).

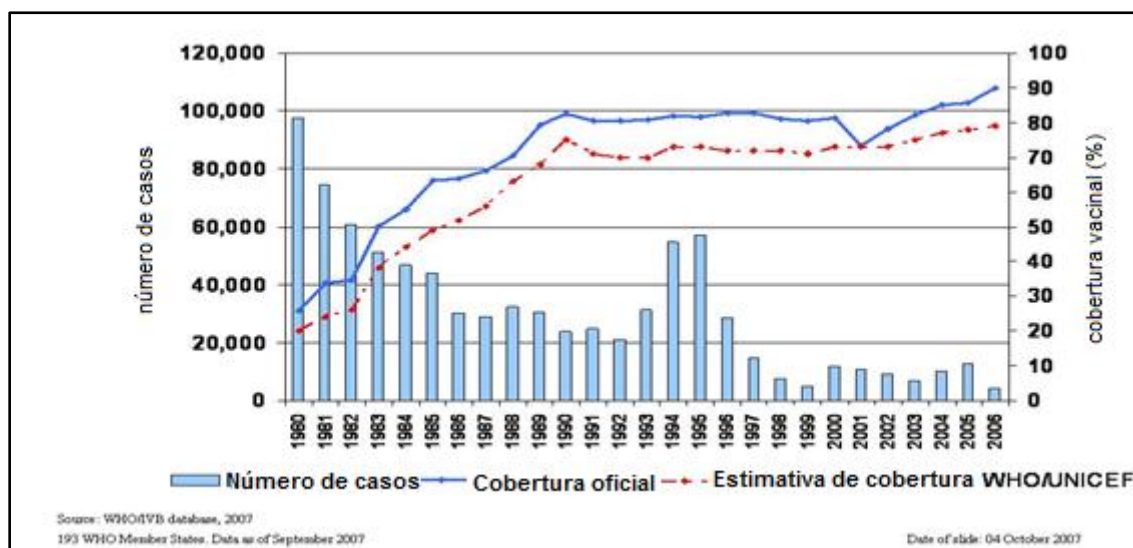


FIGURA 5 – TOTAL DE CASOS DE DIFTERIA x COBERTURA VACINAL DE 1980 A 2006.

FONTE: Departamento de imunização, vacinas e produtos biológicos – OMS (2009). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/who_ivb_2009_eng.pdf. (refere-se à terceira dose da vacina de difteria, tétano e *pertussis* - DTP).

Entre 1972 e 1982, três surtos da doença aconteceram em Seattle envolvendo 1100 pessoas. Em 1984, na Dinamarca, 17 pessoas morreram após surto de difteria. Em 2002, na Califórnia, uma mulher previamente imunizada sobreviveu a uma infecção por *C. diphtheriae*, evidenciando a falha na imunização. Na Finlândia, em 2003, uma criança de três meses não imunizada morreu. Também em 2003, na Pensilvânia, um homem não vacinado morreu de difteria após férias no Haiti. Outros surtos no Canadá e Estados Unidos se desenvolveram na população indígena (RAPPUOLI *et al.*, 1988; HARNISCH *et al.*, 1989; LUMIO *et al.*, 2003; CDC, 2002; CDC, 2004; CHEN *et al.*, 2007).

Nandi *et al.* (2003) relatam uma série de casos de difteria na Índia. Cerca de 70% dos pacientes afetados não haviam sido imunizados contra a doença. A taxa de mortalidade foi de aproximadamente 16%. A pesquisa reforça a importância da imunização da população para o controle da doença.

O número de trabalhos sobre a imunidade em difteria, entre os anos 80 e 90, é vasto e demonstra a preocupação já existente antes das grandes epidemias que ocorreram nos anos 90 em países desmembrados da Ex-URSS. Acredita-se que neste meio tempo os países entraram em uma faixa de estabilidade, onde a doença foi controlada, mas não erradicada. No período de 1980-2000, o número total de casos de difteria notificados reduziu em mais de 90% (MYERS, 1982; KJELDSEN *et al.*, 1985; RAPPUOLI *et al.*, 1988; HARNISCH *et al.*, 1989; LUMIO *et al.*, 2003; NANDI, 2003; OMS, 2006; CHEN *et al.*, 2007; CDC, 2012).

No continente americano o quadro não é diferente. Muitas regiões têm surtos epidêmicos, revelando que a imunização não está sendo eficiente. No Haiti, República Dominicana e Brasil que são países endêmicos, ocorrem surtos apesar dos programas de vacinação são notificados grande número de casos (OPAS, 2012). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), ainda existem casos esporádicos da doença em vários países da América (FIGURA 6), sem levar em consideração casos que não são comunicados às autoridades e diagnósticos equivocados, portanto, não computados (OPAS, 2012).

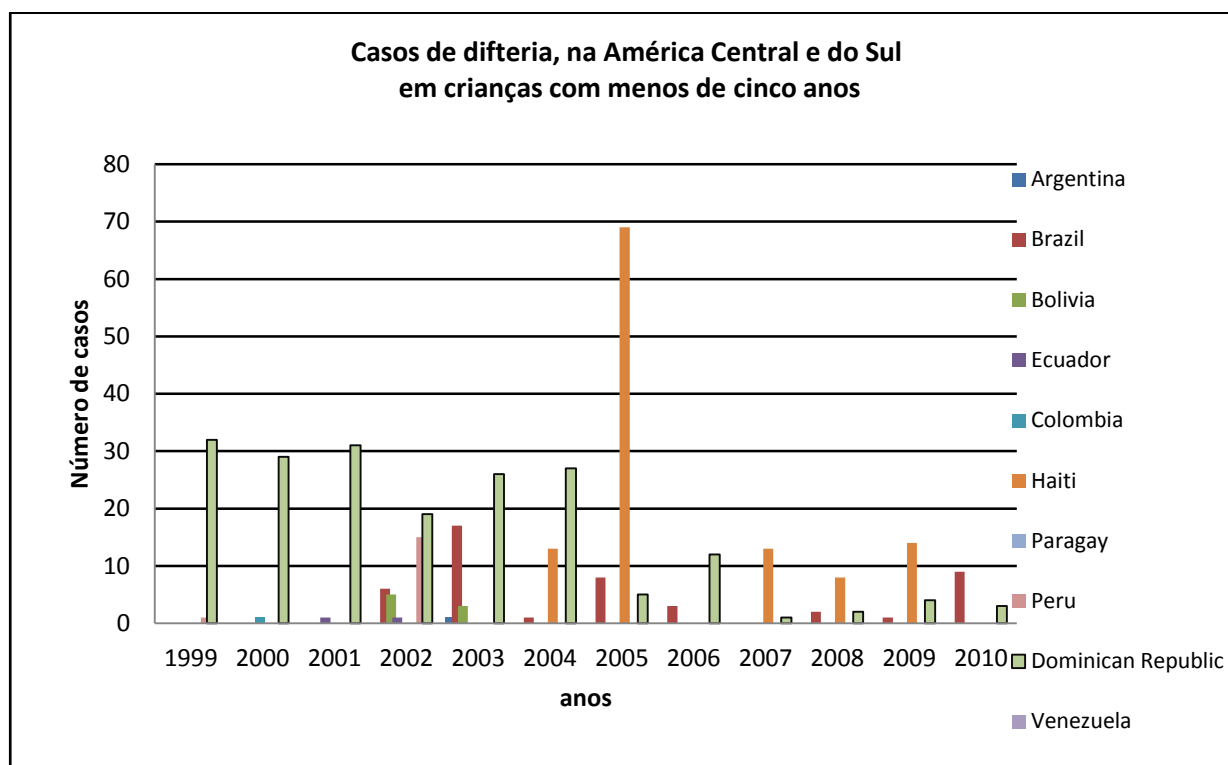


FIGURA 6 – CASOS DE DIFTERIA NO CONTINENTE AMERICANO NOS ÚLTIMOS 10 ANOS.
FONTE: OPAS (2012).

Este trabalho foi desenvolvido visando a obtenção, purificação e avaliação da imunogenicidade de uma proteína recombinante com o propósito de reduzir os efeitos colaterais da vacina de difteria.

3.7 VACINAS

As vacinas contra difteria são produzidas pela via clássica, ou seja, a toxina bacteriana é inativada e usada para induzir a antitoxina protetora. Com a introdução de vacinas contendo toxóide diftérico na vacinação de rotina nos anos de 1940 e 1950, a incidência de difteria caiu drasticamente (GALAZKA *et al.*, 1996).

O toxóide diftérico combinado com tétano e coqueluche nas vacinas DTP tem sido parte do *Expanded Programme on Immunization* (EPI) da OMS desde a sua criação em 1974.

As vacinas atuais, contendo o componente diftérico, ainda são constituídas pelo toxóide. A toxina de 58 kDa é o antígeno vacinal. É obtido pela inativação da toxina com formaldeído a 0,75%, armazenado por 4 a 6 semanas a 37°C, para permitir a detoxificação completa (PAPPENHEIMER, 1984).

Existem quatro vacinas combinadas e utilizadas para prevenir a difteria, tétano e *pertussis* (coqueluche).

A primeira é a vacina denominada DTP (Vacina Tríplice Bacteriana, contra Difteria, Tétano e Pertussis) que tem em seus componentes o toxóide diftérico, o tetânico e o lisado celular de *Bordetella pertussis* (wP – *whole cell Pertussis*) (MMWR, 2010).

A segunda, criada devido à alta incidência de efeitos colaterais da DTP, foi desenvolvida para minimizar estes efeitos e é denominada DTPa (vacina acelular contra coqueluche). A letra minúscula na sigla da vacina representa que a mesma passou por um processo de purificação sendo denominada acelular ou vacina de subunidade. Seu processo de produção passa pela seleção de antígenos capazes de induzir a imunidade contra *B. pertussis*. Para a sua produção, mais uma etapa de purificação é adicionada ao processo (remoção de lipopolissacarídeos - LPS de

membrana). Desta forma é mais segura, porém mais cara. As taxas de reações adversas como vermelhidão, febre e dor são reduzidas em 90%. Esta vacina foi desenvolvida no Japão, em 1981 e é indicada para crianças de até seis anos. Após esta idade, adolescentes e adultos não devem recebê-la (MMWR, 2010).

O terceiro tipo de vacina, a dTpa (Vacina tríplice bacteriana com os componentes diftéricos e pertussis purificados), é indicada para adolescentes e adultos. Foi licenciada nos Estados Unidos, em 2005. Difere das outras anteriores pela concentração reduzida de toxóides de *C. diphtheriae* e *B. pertussis* para minimizar efeitos colaterais. O componente pertussis acelular é similar a DTPa, mas em menor concentração. As vacinas comerciais produzidas com esta tecnologia são Adacel (Sanofi) e a Boostrix (GlaxoSmithKline) (CDC, 2006; MMWR, 2010).

Finalmente o quarto tipo, a vacina DT (Vacina dupla contra Tétano e Difteria) possui os componentes de difteria e tétano, assim como a vacina DTP, mas sem o componente pertussis. A vacina denominada Tétano-difteria (Td – Vacina dupla bacteriana contra tétano e difteria com o componente diftérico purificado), tem concentração de antígeno inferior a DTP e é indicada para adolescentes e adultos (MMWR, 2010).

3.8 VACINAÇÃO

Nos países desenvolvidos, as crianças recebem cinco doses de DTP, uma dose em cada uma das seguintes idades: 2, 4, 6 e 15 a 18 meses e aos 4 e 6 anos.

A DT, que não contém o componente *pertussis*, é utilizada como um substituto para a DTPa em crianças que não toleram a vacina *pertussis* (CDC, 2006; MMWR, 2010).

A Td confere imunidade contra o tétano e difteria, é indicada para adolescentes e adultos, deve ser reforçada a cada 10 anos, ou após exposição ao tétano.

A DTPa possui indicação semelhante a DT, mas também confere proteção contra a *pertussis*. Adolescentes de 11-18 anos e adultos a partir de 19 anos devem receber uma dose única de DTPa. As mulheres grávidas devem receber dTpa

durante cada uma de suas gestações (de preferência no terceiro trimestre entre 27 e 36 semanas). DTpa deve também ser dada entre 7 e 10 anos de idade para crianças com baixo título de proteção contra *pertussis*. DTpa pode ser indicada mesmo que doses anteriores de Td tenham sido anteriormente administradas (MMWR, 2010).

No Brasil, a vacinação contra a difteria foi introduzida em de 1973 no Programa Nacional de Imunização. A vacina utilizada para crianças menores de sete anos é a DTP. Após essa idade, ou em crianças que desenvolvem fortes efeitos colaterais na primeira dose da vacina, deve-se administrar a DTPa. A vacina Td é indicada a adolescentes e adultos, para reforço.

Embora a cobertura vacinal seja elevada em todo o mundo, há uma lacuna na imunidade na população adulta (GALAZKA *et al.*, 1996). Uma redução importante do título de anticorpos é observada logo após um ano da imunização. Das crianças estudadas, 75 a 97% apresentaram títulos protetores contra difteria após a primeira dose de vacina. Durante os dois anos seguintes, o título declina cerca de 40% a cada ano (GALAZKA *et al.*, 1996).

Problemas com a vacinação e imunidade de longa duração vêm sendo relatadas desde a década de 80. Pesquisas sobre a perda de imunidade da difteria revelaram que depois de 10 anos da vacinação, os títulos anti-difteria ficam abaixo do valor de proteção e desta forma as pessoas em contato com o agente patogênico podem desenvolver a doença (MYERS, 1982; KHETSURIANI, 2010). De acordo com a OMS e UNICEF, a cobertura de vacinação ainda é aproximadamente 83% da população mundial, e há uma lacuna evidente nas campanhas de imunização. Embora a vacina seja eficaz na prevenção da morte, a sua eficácia global contra doença sintomática é estimada entre 70 a 90%. Porém, surtos de difteria foram relatados em populações altamente vacinadas o que evidencia falha no protocolo de vacinação (KRUMINA *et al.*, 2005, OHUABUNWO *et al.*, 2005).

Galazka *et al.* (1996), sugerem a alta cobertura de vacinação de grupos-alvo, diagnóstico precoce e o tratamento de casos de difteria com rápida identificação de contatos estreitos para evitar casos secundários. Essas são ações que deveriam ser implantadas para evitar a incidência de novos casos. No mesmo ano, Hardy (1996) sugere que as recomendações em vigor para a vacinação precisam ser revistas para assegurar a imunidade da população e evitar o ressurgimento da doença na Europa

e América do Norte. Em Estocolmo, uma campanha de vacinação tendo como alvo os adultos de uma população resultou na melhoria da imunidade à difteria com apenas alguns efeitos colaterais (Christenson *et al.*, 2001),

Karakus *et al.* (2007) avaliaram os anticorpos contra a toxina da difteria intacta e a toxina da difteria subunidades A e B em 1.319 indivíduos. Os indivíduos com nível de anticorpos elevado foram reagentes frente à subunidade B e os autores sugerem o uso da subunidade para a detecção do título de difteria.

O desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias são necessários para a extensão do período de imunização e redução dos efeitos secundários relacionados às vacinas.

Na TABELA 1 estão descritas as vacinas utilizadas nos programas de vacinação em todo o mundo.

TABELA 1 – VACINAS PRESENTES NAS CAMPANHAS DE VACINAÇÃO MUNDIAL.

Vacinas para crianças < 7 anos	Marca registrada	Produtor	TP (Pertussis)	FHA (Pertussis)	PRN (Pertussis)	FIM (Pertussis)	Toxóide Diftérico	Toxóide Tetânico
DtaP	INFANRIX®	GlaxoSmithKline Biologicals (GSK)	25	25	9	-	5 unidades de limite de floculação (Lf)	10 Lf
DtaP-IPV-HepB	PEDIARIX™	GSK	25	25	8	-	25 Lf	10 Lf
DtaP	DAPTACEL®	Sanofi Pasteur	10	5	3	5	15 Lf	5 Lf
DtaP	Tripedia®	Sanofi Pasteur	23.4	23.4	-	-	6.7 Lf	5 Lf
DtaP+HIB (Tripedia + ActHIB)	TriHIBit®	Sanofi Pasteur	23.4	23.4	-	-	6.7 Lf	5 Lf
DT	No trade name	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	6.7 Lf	5 Lf
Vacinas para pessoas ≥ 7 anos								
Tdap	BOOSTRIX®	GSK	8	8	2.5	-	2.5 Lf	5 Lf
Tdap	ADACEL™	Sanofi Pasteur	2.5	5	3	5	2 Lf	5 Lf
Td	No trade name	Massachusetts Public Health Biologicals Laboratory	-	-	-	-	2 Lf	5 Lf
Td	DECAVAC™	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	2 Lf	5 Lf
Td	TENIVAC™	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	2 Lf	5 Lf
Td	No trade name	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	2 Lf	5 Lf
TT (adsorvida)	No trade name	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	-	5 Lf
TT (<i>booster</i>) (fluido)	No trade name	Sanofi Pasteur	-	-	-	-	-	4 Lf

Legenda: TP – Toxina *pertussis*, FHA – Hemaglutinina filamentosa, PRN – Peractina, FIM – Fimbria, DtaP - vacina tríplice bacteriana, contra difteria, tétano e pertussis acelular, DtaP-IPV-HepB – vacina contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B e polio, DtaP+HIB – Vacina contra difteria, tétano, pertussis acelular e *Haemophilus influenzae*, DT – vacina dupla bacteriana, contra tétano e difteria, Tdap - vacina tríplice bacteriana, contra difteria (componente purificado), tétano e pertussis acelular, Td – vacina dupla de tétano e difteria (componente purificado), TT – Vacina contra tétano.

FONTE: Broder Kr (2006), OMS (2006).

3.9 RISCOS VACINAIS

O risco da administração das vacinas utilizadas nas campanhas de imunização atualmente ainda é muito menor do que o desenvolvimento da doença. No entanto, a vacina pode causar problemas relevantes, como reações alérgicas graves. O risco da vacina DTP causar danos severos e morte é extremamente pequeno (VIS, 2007).

As reações adversas mais comuns são leves como febre (25% dos casos); vermelhidão ou edema no local da vacinação (25%) e dor ou sensibilidade (25%). Esses problemas ocorrem mais frequentemente a partir da quarta dose da DTP. Em alguns casos, no período de um a sete dias após a vacinação, pode surgir edema de todo o braço ou perna (cerca de uma criança em trinta). Outros problemas menores também podem ocorrer, como irritabilidade (cerca de uma criança em três), cansaço ou falta de apetite (cerca de uma criança em cada dez), vômitos (cerca de uma criança em cinquenta). Estes problemas ocorrem de um a três dias após a aplicação da vacina (VIS, 2007).

As reações moderadas como convulsão (1/14 mil crianças vacinadas), choro contínuo (1/1000), febre alta de 39 ou superior (1/16 mil) são pouco frequentes (VIS, 2007).

Reações graves são raras. Existem relatos de reações alérgicas graves (anafilaxia, menos 1/1 milhão de doses), encefalopatias, convulsões prolongadas, coma ou redução de consciência, até mesmo danos cerebrais permanentes. Estas reações são tão raras que se torna difícil dizer se estão realmente relacionadas à vacinação (VIS, 2007; FDA, 2013).

Raros são os casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB). É uma doença neurológica autoimune que causa polirradiculoneurite desmielinizante aguda. Pode ocorrer no período de até 6 semanas após a administração da vacina. Também existem relatos de reações de hipersensibilidade do tipo *Arthus* após a administração da vacina contendo toxóides tetânicos ou diftéricos. Os casos de doenças neurológicas progressivas (incluindo espasmos infantis), epilepsia de difícil controle e encefalopatia progressiva decorrentes da vacinação também são raros (VIS, 2007; FDA, 2013; QUEIROZ, 2013).

Algumas reações são exclusivas da vacina DTPa, como temperatura de 40,5°C ou superior dentro de 48 horas após a vacinação, colapso nervoso ou estado de choque (episódio hipotônico hiporresponsivo, convulsão no prazo de 3 dias após a vacinação, choro persistente com duração de 3 ou mais horas (VIS, 2007).

O desenvolvimento de DTPa é uma tentativa de reduzir estes efeitos secundários, para tornar mais segura a imunização e assegurar a qualidade de vida. Em resumo, a vacina com antigênos purificados e em menor quantidade é capaz de conferir a imunidade necessária com efeitos colaterais mais brandos (MMWR, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da pesquisa para a produção da subunidade B recombinante da toxina de *C. diphtheriae* são apresentadas na FIGURA 7.

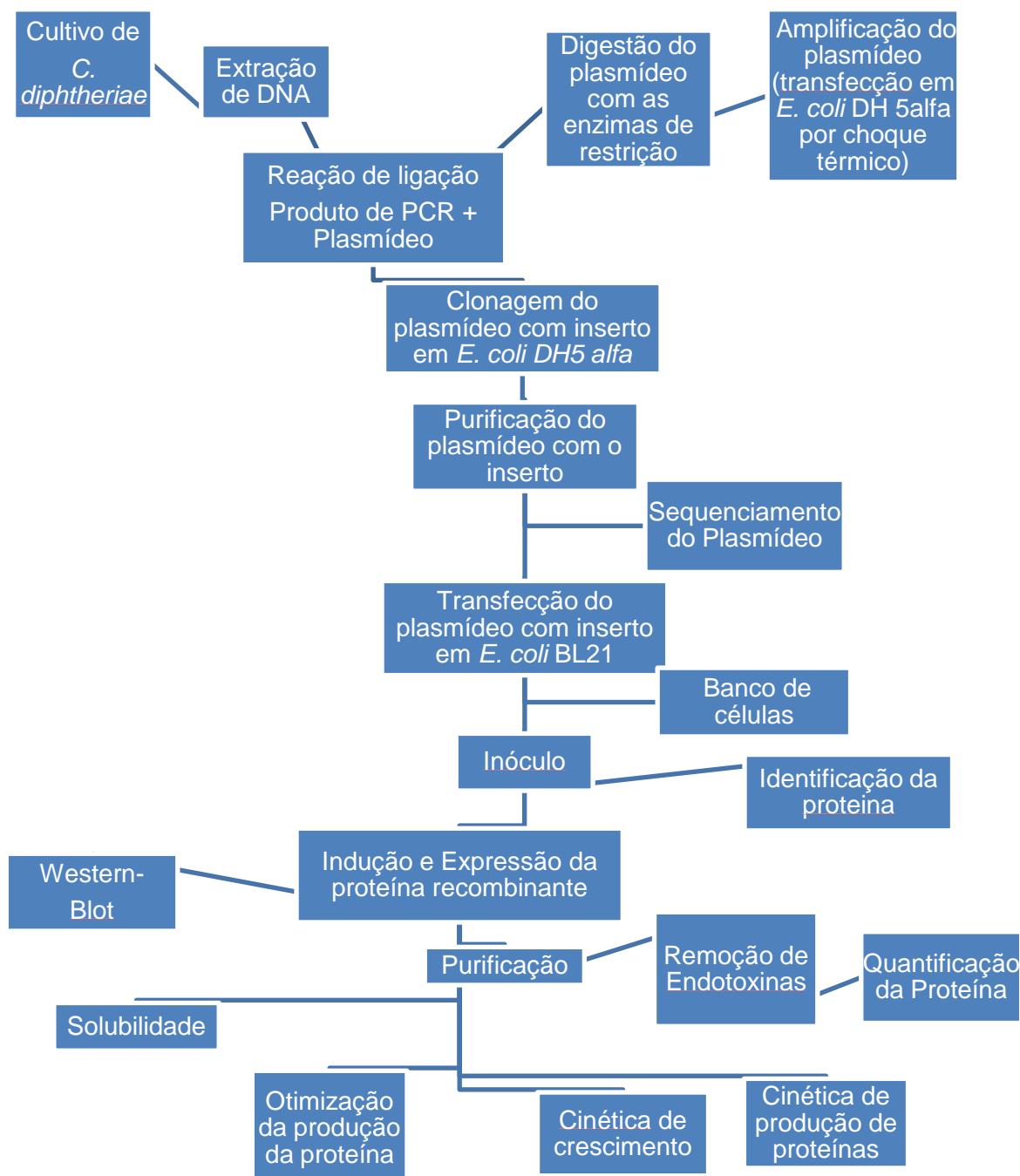


FIGURA 7 – ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DE *C. diphtheriae*.
FONTE: O autor (2014).

4.1 CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA POR PCR

Para a obtenção da sequência de DNA da subunidade B da toxina diftérica, foi realizado o cultivo do patógeno, a extração do DNA e a clonagem por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conforme descrito nos tópicos 4.1.1 a 4.1.3. A FIGURA 8 resume as etapas desenvolvidas.

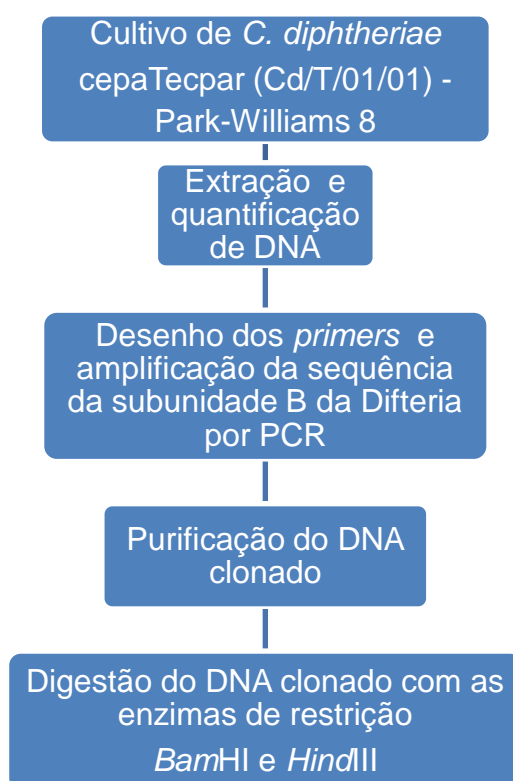


FIGURA 8 – ETAPAS DO PROCESSO DE CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA. FONTE: O autor (2014).

4.1.1 CULTIVO DE *C. diphtheriae* PARA EXTRAÇÃO DE DNA

A cepa de *C. diphtheriae* foi gentilmente cedida pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar (Cd/T/01/01) - Park-Williams 8, na forma liofilizada e armazenada sob refrigeração a -80°C. Trata-se de uma cepa utilizada na produção da vacina diftérica pelo método clássico de fermentação e inativação (LAMPIDI *et al.*, 1971).

O cultivo de *C. diphtheriae* foi realizado em área biocontida no Setor de Desenvolvimento do Laboratório de Antígenos Veterinários, nas instalações do Tecpar.

O meio de cultivo para *C. diphtheriae* foi o proposto por Muller *et al.* (1941) modificado, utilizando NZ amine A (hidrolisado de caseína - Sigma) como fonte de nitrogênio na concentração de 100 mg/mL e adicionados 2 mL da solução de micronutrientes (MgSO₄.7H₂O 22,5g, Beta Alanina 0,115 g, Ácido Nicotínico 0,115 g, CuSO₄.5H₂O (1%) 5 mL, ZnSO₄.7H₂O (1%) 4 mL, MnCl₂.4H₂O (1%) 1,5 mL, HCl 3 mL, H₂O qsp 100 mL), 1 mL de solução de cistina (Cistina 20 g, HCl 20 mL, H₂O qsp 100 mL), e 2,8 mL de solução de maltose (Maltose 50 g, CaCl₂.2H₂O 0,5 g, H₂O qsp 100 mL)). As soluções de aminoácidos e de maltose foram precipitadas previamente por duas vezes com CaCl₂ 0,1M para a retirada do ferro (20 mL, 80 – 90°C, pH 7,8 – 8,0), que é limitador do crescimento de *C. diphtheriae*.

Uma ampola liofilizada foi aberta em fluxo laminar, previamente higienizado, e o material foi diluído em 6 mL de solução salina (NaCl 0,9%), homogeneizado e inoculado nos meios de cultivo (sólido e líquido). Foram inoculados 100 µL da solução salina contendo a cepa de *C. diphtheriae* em tubos de ensaio de 50 mL e placas de Petri (100 x 15 mm), com meio sólido (MULLER *et al.*, 1940 - adicionado ágar bacteriológico 1,5%) para verificar o crescimento de colônias isoladas, a morfologia e a pureza do cultivo. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 72 horas de (HEINEMANN, 1908) e armazenados a 4°C até o uso do microrganismo. Da mesma forma, foram utilizados 5 mL da suspensão de células de *C. diphtheriae* para inocular um frasco Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio de cultivo (MULLER *et al.*, 1940) e incubado em agitador orbital a 37°C, 150 rpm por 72 horas.

Após o final do cultivo, o meio foi distribuído em tubos cônicos de 50 mL e colocado em banho-maria a 100°C por 30 minutos para a inativação da toxina e realizada centrifugação a 5.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo a biomassa foi armazenado a 4°C, para posterior extração do DNA do microrganismo.

A confirmação da identificação do patógeno foi realizada por meio de coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2001) e verificação macroscópica das colônias no meio sólido.

4.1.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA DO MICRORGANISMO

O *pellet* obtido na etapa anterior foi ressuspenso em 100 μ L de cultivo líquido e centrifugado 5.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi utilizado para a extração do DNA, realizada segundo combinação dos protocolos de congelamento/descongelamento e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Resumidamente, o sedimento foi ressuspenso em 500 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) e homogeneizado por pipetagem. Foram realizados três ciclos de congelamento / descongelamento (-70°C, 5 minutos e 80 - 95°C, 2 minutos), adicionados 10 μ L de lisozima (10 mg/mL) e incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida foram adicionados 5 μ L de SDS 10% e 5 μ L de proteinase K (20 mg/mL). A solução foi homogeneizada e incubada 1 hora a 55°C. Após, foi aquecida a 95°C por 10 minutos para a desnaturação da proteinase K. O microtubo de 2 mL contendo a suspensão foi centrifugado a 1.000 *g*, 5 minutos a 4°C. Ao sedimento foram adicionados 0,01 volumes de RNase (20 mg/mL) e incubado 37°C, por 30 minutos. Após, foi adicionado 0,01 volumes fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado por 5 minutos e centrifugado a 12.000 *g* por 5 minutos a 4°C em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 2 mL.

Foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, homogeneizado suavemente e centrifugado por 5 minutos nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foram adicionados 0,01 volumes de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 volumes de etanol (-20°C) e homogeneizados. A amostra foi centrifugada a 12000 *g* por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70°GL nas mesmas condições de centrifugação.

Na sequência, o *pellet* de DNA foi seco a 37°C e reidratado com 50 μ L de água ultrapura em temperatura de 4°C *overnight* e acondicionado a -20°C até seu o momento do uso.

A quantidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria em ambos os comprimentos de onda (260/280 nm). A concentração e pureza de DNA presentes na amostra foram calculadas pela seguinte equação:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs}_{260} \times 50 \times \text{FD}$$

Para a verificação da qualidade e pureza do DNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e corrida a 80 V por 1 hora em cuba horizontal com tampão TE. O gel foi corado com Brometo de Etídio (5 $\mu\text{g/mL}$) e visualizado sob luz ultravioleta (UV). A migração das bandas foi comparada com o uso de 3,5 μL do marcador de 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™).

4.1.3 CLONAGEM POR PCR DA SUBUNIDADE B PARA TRANSFEÇÃO

O vetor pAE foi gentilmente cedido pelo professor Odir Dellagostin (UFPEl) e escolhido por apresentar diversas vantagens como: não ser comercial, ter origem de replicação em *E. coli*, sítios múltiplos de clonagem, gene de resistência a ampicilina; forte promotor do fago T7; indução por IPTG e a inclusão de calda de poli histidina na proteína clonada (FIGURA 9).

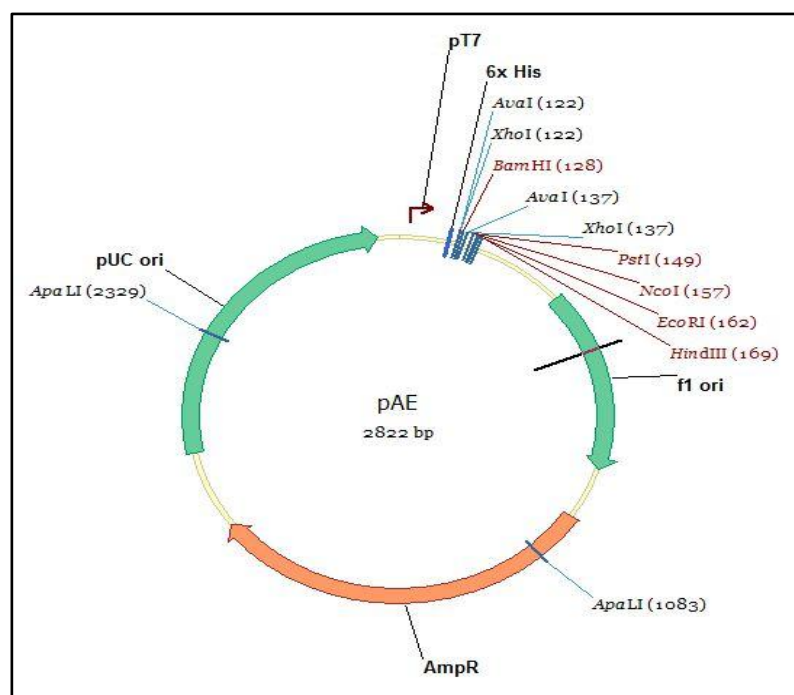


FIGURA 9 – DESENHO DO VETOR pAE.
FONTE: Vector Invitrogen (2014).

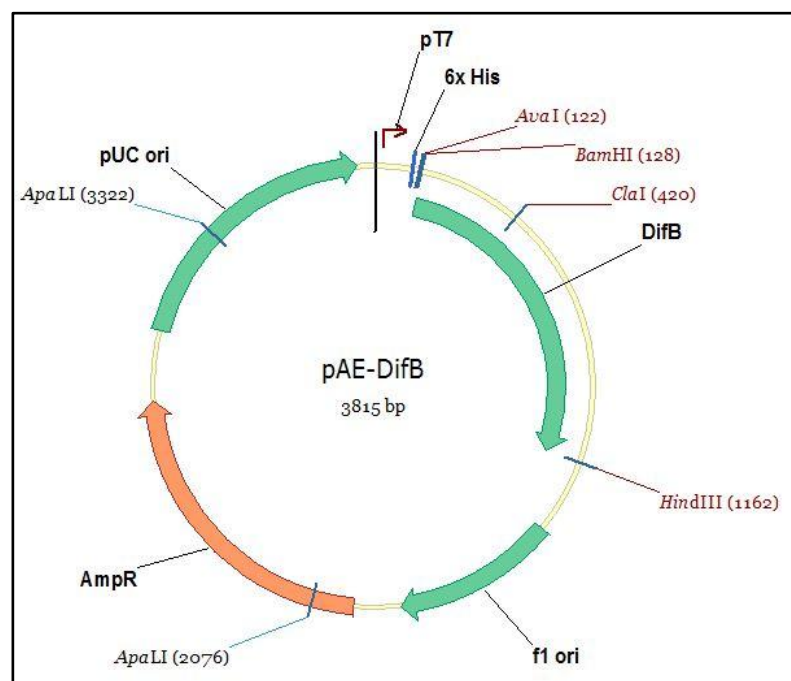


FIGURA 10 – O VETOR pAE COM O INSERTO DIFB.

FONTE: Vector Invitrogen (2014).

O desenho dos iniciadores (*primers*) para a correta amplificação da região de interesse do DNA, a cadeia B da toxina diftérica, foi realizado com o auxílio do *software* Vector NTI (Invitrogen®) sob orientação do Professor Odir Dellagostin da Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

Foram desenhadas duas sequências de iniciadores. O *primer sense* (PS) com sítio de restrição *Bam*HI (5'...G GATCC...3') (5'...GACGGATCCTCAGTAGGTAGCTCATTGTC...3') e o *primer antisense* (PA) com sítio de restrição *Hind*III (5'...A AGCTT...3') (5'...GGCAAGCTTCAGCTTTTGATTTCAAAAATAGCG...3') para possibilitar a correta ligação, no sentido correto ao vetor e a direta clonagem dos *amplicons* em plasmídeo de expressão.

Os iniciadores correspondem à região 193 a 534 pares de base (pb) da toxina diftérica, referente a subunidade B. Foram adicionados alguns oligonucleotídeos que antecedem e finalizam o gene da subunidade B para a inserção dos sítios de restrição. As sequências dos iniciadores foram preparadas pela Eurofins MWG/Operons.

A sequência do gene que contém a informação da proteína da subunidade B da toxina diftérica foi obtida no GenBank GeneID gb KF013950.1 (GREENFIELD *et*

al., 1983). Trata-se de uma sequência de 1026pb, totalizando 1046pb com os nucleotídeos iniciadores contendo os sítios de restrição para as enzimas acima mencionadas (FIGURA 10). A sequência do gene da subunidade B (TABELA 2) foi clonada com o pareamento dos iniciadores (*primers*) nas regiões destacadas (negrito). Foram excluídos os 579pb iniciais da sequência da toxina, por se tratar da porção que possui atividade tóxica.

A reação de PCR foi preparada com GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), seguindo o protocolo do fabricante com 1 µL de DNA da bactéria na concentração de 10 ng/ µL para cada 50 µL de reação (GoTaq® Flexi Buffer 1x 10 µL, *Primer F* (20 picogramas) 2 µL, *Primer R* (20 picogramas) 2 µL, dNTP (10 mM), 4 µL (1 µL de cada), GoTaq® DNA Polimerase (5U/ µL) 0,25 µL, MgCl₂ 25 mM, 3 µL, DNA molde 1 µL, água qsp 50 µL).

A PCR foi conduzida em termociclador da marca *Eppendorf*® com um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos para a desnaturação, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos para a desnaturação; 55°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por um minuto para a extensão, a extensão final foi de 72°C por 5 minutos.

O fragmento clonado por PCR foi purificado utilizando o kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare™), seguindo o protocolo do fabricante. O resultado da purificação da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%, 80 V durante 1 h para verificar sua qualidade e concentração, conforme tópico 4.1.2.

Em seguida, a sequência clonada foi usada na ligação com o vetor de clonagem. A concentração do DNA purificado foi avaliada por espectrometria a 260 conforme tópico 4.1.2.

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS CADEIA B DA TOXINA DIFTÉRICA, COM OS AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTES.

TCAGTAGGTAGCTCATTGTC ATGCATAAAT	193	CTTGATTGGGATGTCATAAGGGATAAAACT	213
Ser.Val.Gly.Ser.Ser.Leu.Ser.Cys.Ile.Asn		Leu.Asp.Trp.Asp.Val.Ile.Arg.Asp.Lys.Thr	
AAGACAAAGATAGAGTCTTTGAAAGAGCAT	223	GGCCCTATCAAAAATAAAATGAGCGAAAGT	233
LysThrLysIleGluSerLeuLysGluHis		GlyProlLeLysAsnLysMetSerGluSer	
CCCAATAAAACAGTATCTGAGGAAAAAGCT	243	AAACAATACCTAGAAGAATTTTCATCAAACG	253
ProAsnLysThrValSerGluGluLysAla		LysGlnTyrLeuGluGluPheHisGlnThr	
GCATTAGAGCATCCTGAATTGTCAGAACTT	263	AAAACCGTTACTGGGACCAATCCTGTATTTC	273
AlaLeuGluHisProGluLeuSerGluLeu		LysThrValThrGlyThrAsnProValPhe	
GCTGGGGCTAACTATGCGGCGTGGGCAGTA	283	AACGTTGCGCAAGTTATCGATAGCGAAACA	293
AlaGlyAlaAsaTyrAlaAlaTrpAlaVal		AsnValAlaGlnValIleAspSerGluThr	
GCTGATAATTTGGAAAAGACAAGTCTGCT	303	CTTTCGATACTTCTGGTATCGGTAGCGTA	313
AlaAspAsnLeuGluLysThrThrAlaAla		LeuSerileLeuProGlyIleGlySerVal	
ATGGGCATTGCAGACGGTGCCGTTCAACCAC	323	AATACAGAAGAGATAGTGGCACAATCAATA	333
MetGlyIleAlaAspGlyAlaValHisHis		AsnThrGluGluIleValAlaGlnSerIle	
GCTTTATCGTCTTTAATGGTTGCTCAAGCT	343	ATTCCATTGGTAGGAGAGCTAGTTGATATT	353
AlaLeuSerSerLeuMetValAlaGlnAla		IleProLeuValGlyGluLeuValAspIle	
GGTTTCGCTGCATATAATTTTGTAGAGAGT	363	ATTATCAATTTATTTCAAGTAGTTCATAAT	373
GlyPheAlaAlaTyrAsnPheValGluSer		IleIleAsnLeuPheGlnValValHisAsn	
TCGTATAATCGTCCCGCGTATTCTCCGGGG	383	CATAAAACACAACCATTTCTTCATGACGGG	393
SerTyrAsnArgProAlaTyrSerProGly		HisLysThrGlnProPheLeuHisAspGly	
TATGCTGTCAAGTTGGAACACTGTTGAAGAT	403	TCGATAATCCGAAGTGGTTTTCAAGGGGAG	413
TyrAlaValSerTrpAsnThrValGluAsp		SerIleIleArgThrGlyPheGlnGlyGlu	
AGTGGGCACGACATAAAAATTACTGCTGAA	423	AATACCCCGCTTCCAATCGCGGGTGTCTTA	433
SerGlyHisAspIleLysIleThrAlaGlu		AsnThrProLeuOrillealaGlyValLeu	
CTACCGACTATTCTGGAAGCTGGACGTT	443	AATAAGTCCAAGACTCATATTTCCGTAAAT	453
LeuProThrIleProGlyLysLeuAspVal		AsnLysSerLysThrHisIleSerValAsn	
GGTCGGAAAATAAGGATGCGTTGCAGAGCT	463	ATAGACGGTGATGTAACTTTTTGTGCCCCCT	473
GlyArgLysIleArgMetArgcysArgAla		IleAspGlyAspValThrPheCysArgPro	
AAATCTCCTGTTTATGTTGGTAATGGTGTG	483	CATGCGAATCTTCACGTGGCATTTCACAGA	493
LysSerProValTyrValGlyasnGlyVal		HisAlaAsnLeuHisValAlaPheHisArg	
AGCAGCTCGGAGAAAATTCATTCTAATGAA	503	ATTCGTCGGATTCCATAGCGTTCTTGGG	513
SerSerSerGluLysIleHisSerAsnGlu		IleserSerAspSerIleGlyValLeuGly	
TACCAGAAAACAGTAGATCACACCAAGGTT	523	AATTCTAAGCTATCGCTATTTTTTGAATC	533
TyrGlnLysThrValAspHisThrLysVal		AsnSerLysLeuSerLeuPhePheGluIle	
AAAAGCTGA	536		
LysSerTer			

FONTE: o autor (2014)

4.2 TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

A transfecção das células hospedeiras foi realizada por choque térmico (descrito no item 4.2.2). Nesta etapa, foram utilizadas as células de *E coli* DH5alfa e BL21 pLysS, para a replicação dos plasmídeos (pAE e pAE com inserto) e para a expressão da proteína de interesse (FIGURA 11).

4.2.1 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES *E. coli* DH5alfa™ e BL21 pLysS™

Para produção das células quimiocompetentes e dos cultivos posteriores, foram produzidas solução de estoque de ampicilina na concentração de 100 mg/L com água ultrapura e solução de estoque de cloranfenicol na concentração de 25 mg/L em etanol 70%. Ambas as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana 0,22 µm, em fluxo laminar, aliquotadas em tubos esterilizados e mantidas refrigeradas a -80°C até o momento do uso.

O meio Luria-Bertani (LB) foi preparado conforme instruções do fabricante, com 25 g do meio em pó (Sigma-Aldrich) em um litro de água ultrapura e o pH ajustado para 7,8. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e mantido refrigerado a 8°C até o momento do uso.

O meio ágar LB foi preparado com a adição de 20 g de ágar bacteriológico por litro do meio LB, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após retirado da autoclave foi vertido em fluxo laminar, em placas de Petri, previamente esterilizadas e mantido refrigerado a 8°C até o momento do uso.

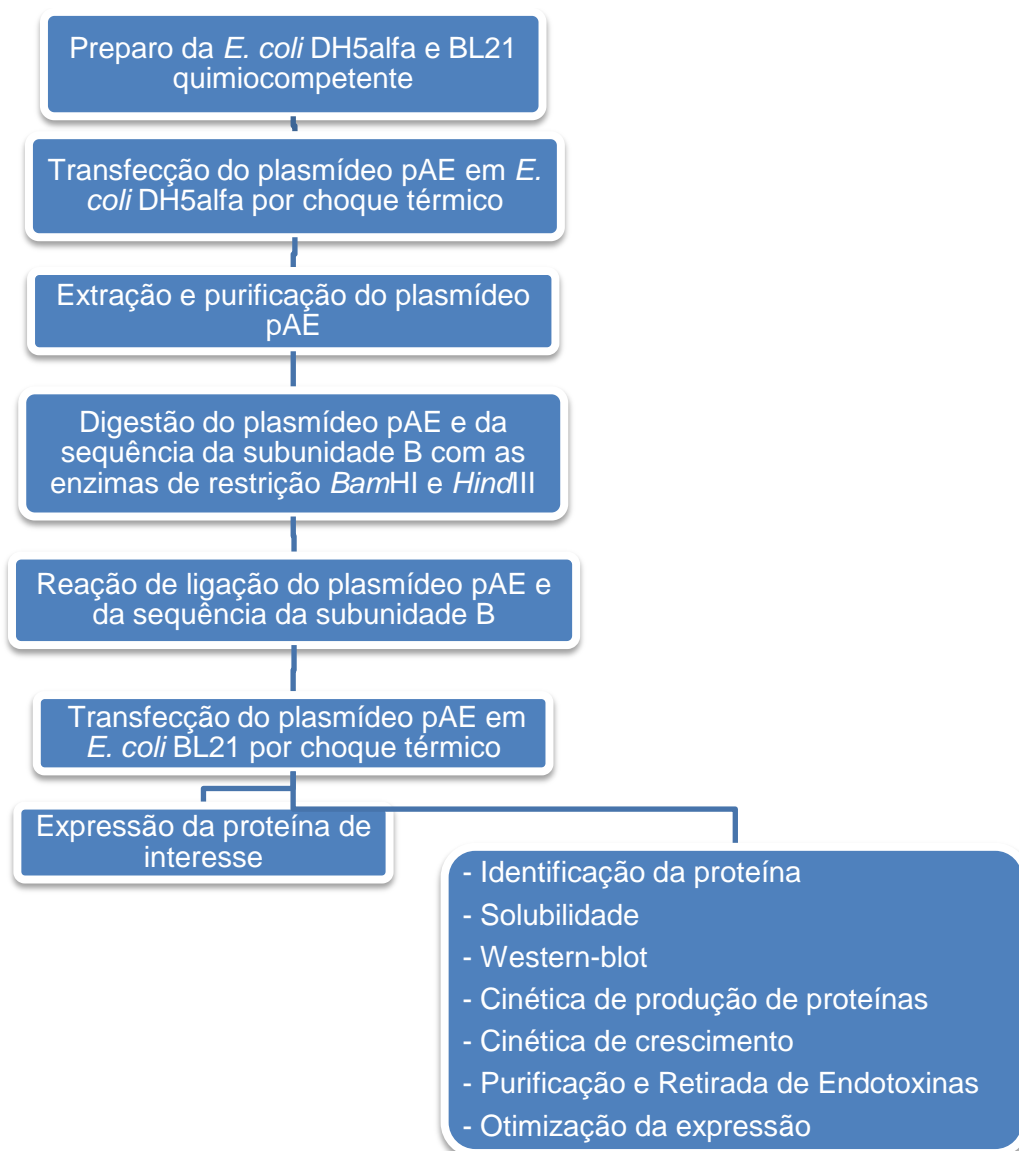


FIGURA 11 – ETAPAS DA PRODUÇÃO DAS CÉLULAS RECOMBINANTES
 FONTE: o autor.

O meio LB seletivo foi elaborado adicionando as soluções estoque dos antibióticos (ampicilina 100mg/L e cloranfenicol 25mg/L) previamente preparados em temperatura ambiente adicionados sempre no momento do uso. Para o meio LB ágar seletivo, a adição dos antibióticos foi realizada com o meio a 30°C, momentos antes de ser plaqueado.

A *E. coli* DH5alfa™ (Invitrogen™) foi usada nos procedimentos de clonagem do plasmídeo pAE (pAE com e sem inserto). As células *E. coli* BL21™pLysS (Invitrogen™) foram utilizadas para a expressão da proteína de interesse. Para tal, um banco de células quimiocompetentes foi produzido para *E. coli* DH5 alfa™ e outro

para BL21TM pLysS. Foram isoladas 10 colônias de ambas as cepas de *E.coli*, e repicadas em 20 mL separadamente em meio LB e cultivadas por 3 horas, a 37°C sob agitação a 180 rpm, até atingir a absorbância de A600 = 0.5. Em seguida, os cultivos foram centrifugados em tubos cônicos esterilizados de 50 mL a 3.000 g, 4°C por 10 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 20 mL de solução resfriada em gelo de MgCl₂ 0,1 M. Após homogeneização por inversão (1 minuto), os tubos foram centrifugados a 3.000 g, 4°C por 10 minutos. Os sedimentos celulares foram novamente ressuspensos em 20 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M resfriada em gelo, homogeneizado por inversão por 1 minuto e incubado durante 30 minutos a 4 °C. Novamente foi realizada centrifugação a 3.000 g, a 4°C por 10 minutos em tubos cônicos esterilizados. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução resfriada em gelo de CaCl₂ 0,1 M e adicionado 100 µL de glicerol esterilizado. Foram preparadas alíquotas de 100 µL em criotubos e armazenadas a -80 C, criando o banco de células *E. coli* DH5 alfaTM e BL21TM pLysS. Para testar a viabilidade celular, um criotubo de ambos os bancos foi retirado e cultivado em meio LB com antibiótico.

4.2.2 PREPARO DO PLASMÍDEO

Foi preparado inicialmente um estoque de pAE. Para esta etapa o plasmídeo foi clonado em *E. coli* DH5 alfa. O protocolo de transfecção adotado foi o por choque térmico. As células quimocompetentes de *E. coli* DH5 alfa (item 4.2.1) foram incubadas em banho de gelo por cerca de 15 minutos. Em 20 µL de solução de células quimocompetentes de *E. coli* DH5 alfa foram adicionados 5 ng (2 µL) de DNA do plasmídeo e incubado por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida, foram incubados por 90 segundos a 42°C, retornando por mais 2 minutos ao banho de gelo. Foram adicionados 200 µL de meio de cultivo LB e incubado a 37°C por 2 horas em agitador rotativo a 180 rpm. Estes 200 µL foram inoculados em placas de Petri, contendo meio LB com ampicilina (100mg / L) e incubados a 37°C *overnight*. As colônias transformadas com o plasmídeo pAE, que cresceram na placa de Petri, foram submetidas a uma triagem com extração de DNA, para confirmar a presença do plasmídeo e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

As células foram inoculadas em 5 mL de meio LB com ampicilina, incubadas *overnight* em agitador rotativo a 180 rpm a 37°C. Para a extração de plasmídeo, foi utilizado o kit Illustra plasmidPrep mini spin kit™ (GE Healthcare™) e a eficácia verificada em eletroforese em gel de agarose (tópico 4.1.2).

O plasmídeo obtido e o produto da PCR do tópico 4.1.3 foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *Bam*HI (ThermoScientific) e *Hind*III (Promega), de acordo com os protocolos dos fabricantes (Digestão *Bam*HI: água ultrapura 28 µL, tampão 5 X 5 µL, DNA de interesse 15 µL, *Bam*HI 2 µL, totalizando 50 µL, em reação *overnight* a 37°C, recuperado em 25 µL após purificação como kit GFX™ PCR DNA e *Gel Band Purification* - GE Healthcare™. Digestão com *Hind*III: água ultrapura 22,5 µL, tampão 5X 5 µL, BSA 0,5 µL, DNA de interesse 20 µL, *Hind*III 2 µL, totalizando 50 µL, em reação por 2 horas a 37°C, recuperado em 25 µL após purificação com o kit GFX™ PCR DNA e *Gel Band Purification* - GE Healthcare™). As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e a eficácia da digestão foi determinada em gel de agarose a 1,0% conforme tópico 4.1.2.

4.2.3 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PLASMÍDEO E O INSERTO

A reação de ligação entre o plasmídeo pAE e o inserto (subunidade B da toxina diftérica) foi realizada com DNA ligase de T4 (Promega™) *overnight* a 4°C seguindo o protocolo do fabricante (TABELA 3).

Para confirmar a presença do inserto no plasmídeo e o sucesso da ligação, foi realizada digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição (conforme realizado no tópico 4.2.2) e verificado em gel de agarose a 1,0% conforme descrito no tópico 4.1.2.

TABELA 3 – REAÇÃO DE LIGAÇÃO.

	DifB	pAE (controle negativo)
Vetor	5 µL	5 µL
Inserto	8 µL	-----
Tampao 10X	2 µL	2 µL
T4 DNA ligase	1 µL	1 µL
Água Ultrapura	4 µL	12 µL
TOTAL	20 µL	20 µL

FONTE: o autor (2014).

4.2.4 CLONAGEM DO PLASMÍDEO pAE LIGADO A SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA

O plasmídeo pAE ligado à sequência da subunidade B da toxina diftérica clonada foi utilizado para transfectar *E. coli* DH5alfa para replicação do plasmídeo. Uma alíquota de 20 µL das células quimocompetentes de *E. coli* DH5alfa (preparadas conforme tópico 4.2.1) com 5 ng de plasmídeo foram utilizadas para a realização da transfecção por choque térmico (conforme tópico 4.2.2).

As colônias transformadas com o plasmídeo ligado ao inserto foram submetidas à triagem para avaliar a eficiência do choque térmico. Foram inoculadas em 5 mL de meio LB com ampicilina, incubadas *overnight* e o plasmídeo foi extraído conforme tópico 4.2.2. A concentração foi determinada por espectrofotometria a 260 nm. A eficácia da digestão foi determinada em gel de agarose a 1,0% conforme tópico 4.1.2.

O plasmídeo com o inserto clonado no cultivo de *E. coli* DH5alfa e purificado foi utilizado para a transfecção de células de expressão de *E. coli* BL21 pLysS. As células de *E. coli* BL21 pLysS quimicompetentes (produzidas no tópico 4.2.1) foram transformadas por choque térmico, conforme descrito anteriormente (tópico 4.2.2).

Foram adicionados 200 µL de meio de cultivo LB e incubado a 37°C durante 2 horas em agitador rotativo a 180 rpm. Passadas 2 horas, estes 200 µL foram inoculados em meio LB contendo ampicilina 100 mg/L e cloranfenicol 25 mg/L, para a manutenção dos genes de resistência (o plasmídeo pAE com inserto e o plasmídeo pLysS) formando o pré-inóculo. As células *E. coli* BL21 pLysS não transformadas incubadas em caldo LB não seletivo (sem antibióticos) foram utilizadas como controle negativo.

Para verificar a presença do plasmídeo com o inserto nas colônias, foi realizada triagem para confirmação e análise por eletroforese em gel de agarose (conforme tópico 4.1.2).

O banco de células *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pAE com o inserto (sequência B da toxina diftérica, DifB) foi produzido e armazenado a -80°C até o momento da utilização, conforme descrito no tópico 4.2.1.

4.2.5 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.2.5.1 CULTIVO DE *E. coli* BL21 pLysS TRANSFORMADA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS

Para o teste de indução, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 10 mL de meio LB com antibióticos (Ampicilina 100 mg/L e Cloranfenicol 25 mg/L), e incubado em agitador rotativo a 37°C e 180 rpm até a cultura atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm. A indução da expressão foi realizada com IPTG 0,3 mM durante 3 horas.

Uma amostra do cultivo foi retirada para análise por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A metodologia foi realizada segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 5 minutos em tampão de amostra (tris-HCl 51 0,1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de bromofenol a 0,001 M). O gel concentrador foi preparado a 7% e o gel fracionador na concentração de 10%, (Sambrook e Russel, 2001).

O gel foi corado com azul de *Coomassie*, dissolvido em solução fixadora por 45 minutos (45 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial; 45 mL de água destilada). Após este tempo, o gel foi lavado com a solução fixadora para a remoção do excesso de corante.

4.2.5.2 SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA

O teste de solubilidade é importante para verificar em qual das frações do cultivo está a proteína recombinante pesquisada. A mesma pode estar no sobrenadante ou em corpúsculos de inclusão. Um criotubo proveniente do banco de *E. coli* BL21 pLysS transformada com o plasmídeo pAE com o inserto, foi inoculado em 9 mL de caldo de LB com antibióticos e incubado por 12 horas a 37°C e em agitador rotativo 150 rpm. Em seguida, a cultura foi usada para inocular 100 mL do

mesmo meio e mantido em agitador, sob as mesmas condições até que obter a absorbância de 0,8. Quando a cultura atingiu a absorbância esperada, foi adicionando IPTG (0,3 mM) e a indução foi realizada por 3 horas.

A cultura final foi centrifugada a 7.000 g 4°C por 15 minutos, o sedimento celular foi lavado com PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, pH 7.4). Centrifugou-se outra vez nas mesmas condições e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de tampão fosfato (20 mM Na₂HPO₄, pH 8,0). Quatro ciclos de sonicação de 20 segundos, com o mesmo tempo de intervalo em banho de gelo, foram realizados para a ruptura celular e liberação dos corpúsculos de inclusão. Em seguida, o tubo contendo o material lisado, foi centrifugado a 15.000 g a 4°C por 10 minutos para a precipitação de corpúsculos de inclusão. O sobrenadante foi armazenado a 4°C e denominado fração solúvel. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de tampão de solubilização (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 6 M de ureia, pH 8,0) e um novo ciclo de sonicação e centrifugação foi realizado. O sobrenadante obtido foi denominado de fração insolúvel. Ambas as frações foram aplicadas em gel SDS-PAGE, conforme descrito no tópico 4.2.5.1.

4.2.5.3 WESTERN BLOT COM ANTICORPO ANTI-HIS6

Após a eletroforese em SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel da proteína recombinante (tópico 4.2.5.2), o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol a 20%) por 10-30 minutos. A membrana foi preparada em 100% de metanol por 15 segundos, lavada com água ultrapura por 15-20 segundos e a seguir equilibrada em tampão de transferência, por 5 minutos. A transferência foi realizada com a sequência: suporte negativo/ esponja/ papel filtro/ gel/ membrana/ papel filtro/ esponja/ suporte positivo. O “sanduíche” foi colocado na cuba e coberto com tampão de transferência. A transferência foi conduzida a 24V a 4°C *overnight*. Após, a tensão foi aumentada para 48 V e mantido por mais uma hora.

A membrana foi retirada e bloqueada com tampão de bloqueio (10% p / v) leite Molico®, 1x PBS, 0,05% Tween-20) por uma hora com agitação suave.

Posteriormente, a membrana foi colocada em solução com o anticorpo primário anti-His (GE Healthcare™) diluído 1: 3.000 em tampão de bloqueio. Foi incubado por uma hora à temperatura ambiente com agitação suave. A membrana foi então lavada três vezes por 5 minutos com tampão de lavagem (1x PBS, 0,05% Tween-20) e incubada com anticorpo anti-mouse secundário (1:10.000 em tampão de lavagem). A membrana foi lavada novamente, por três vezes, durante 5 minutos com tampão de lavagem e duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos. A membrana foi incubada com revelador (10 mg de DAB -3,3 '-diaminobenzidina- em 15 mL de tampão (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,6) por 5 minutos e bloqueada com tampão PBS.

4.2.5.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E CRESCIMENTO CELULAR

Durante o crescimento celular e indução da proteína recombinante, foram coletadas alíquotas de 2 mL a cada hora para avaliar a influência do tempo de indução no crescimento celular. Essas frações coletadas foram centrifugadas por 5 minutos, a 11.000 g 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em 200 µL de tampão de solubilização e submetido por quatro ciclos de sonicação de 5 segundos, cada com o mesmo intervalo de tempo em banho de gelo e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi armazenado a 4°C para posterior análise em gel SDS-PAGE, conforme tópico 4.2.5.2.

A determinação da concentração celular foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm do meio de cultivo, nos diferentes tempos. Dois parâmetros cinéticos foram utilizados para avaliação do crescimento celular bacteriano: velocidade específica de crescimento (μ) e velocidade de crescimento (dx/dt), segundo as equações:

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0);$$

$$dx/dt = \mu \cdot x_t;$$

onde: μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

x_t = concentração celular no tempo t em base seca (g/L)

x_0 = concentração celular inicial em base seca (g/L)

t = tempo final (h)

t_0 = tempo inicial (h)

dx/dt = velocidade de crescimento (g/L.h)

As concentrações celulares foram determinadas pela multiplicação do valor de absorbância por 0.35. Segundo LIMA (2004), para cultivos de *E. coli* recombinante, 1.0 unidade de absorbância em 600 nm equivale a uma concentração celular de 0,35 g/L em biomassa seca.

4.2.5.5 OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para verificar a importância e o efeito dos fatores estudados foi realizado um planejamento experimental do tipo fatorial fracionado 3 (3-1), com três repetições no ponto central. Este método estatístico permite determinar a significância de cada um dos fatores analisados para o processo. Para a otimização do processo de produção de proteína recombinante, os fatores levados em consideração foram: concentração de indutor (IPTG), tempo de indução e temperatura de indução. Os níveis estudados de tempo de indução foram determinados por meio do estudo anterior descrito no tópico 4.2.5.4. Os níveis das outras variáveis foram definidos como são usualmente feitos para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* (PAPANEOPHYTOU, KONTOPIDIS, 2012) (TABELA 4).

TABELA 4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: FATORES E NÍVEIS ESTUDADOS NA OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA.

Fatores	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	31	37
Indutor (IPTG mM)	0,1	0,5	0,9
Tempo de indução (h)	2	3	4

FONTE: o autor (2014).

Para a realização do estudo, um criotubo de *E. coli* BL21 pLysS recombinante do banco de células foi utilizado para inocular 10 mL de meio LB com antibióticos para cada experimento. Após crescimento por 12 horas, a cultura foi inoculada em 100 mL de caldo de LB com antibióticos. O crescimento celular e coleta de amostras foram efetuadas tal como descrito no tópico 4.2.5.2. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 10%, 80 V por 3 horas.

O gel foi analisado com auxílio do *software* ImageJ versão 1.32j (domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que quantifica as bandas por meio de análise computadorizada de imagem. Este *software* detecta a absorbância de cada banda do gel fornecendo um número arbitrário que corresponde ao número de pixels que compõe a seleção. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de absorbância para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar a banda de interesse (uma de cada vez), devendo ser igual para todas as bandas analisadas. O valor final de intensidade relativa é correspondente ao sinal gerado por cada banda. Por se tratar de números essencialmente arbitrários, os dados gerados pelo programa só fazem sentido no contexto do conjunto de picos selecionados para a análise e somente no gel que está sendo analisado, não possuindo unidade e nem permitindo extrapolações (FERREIRA T. *et al.*, 2012). O objetivo da utilização do programa foi comparar as bandas de produção de proteína nas diferentes condições testadas e entre si. Para a análise estatística desses dados, foi utilizado o *software* Statistica 5.0.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *E. coli* BL21

A estratégia da adição da calda de poli-histidina na proteína recombinante, teve como objetivo facilitar as etapas finais da purificação. A calda de poli-histidina possibilita a purificação por cromatografia líquida de afinidade utilizando coluna de níquel por se ligar a este metal com eficiência. Desta forma, proteínas contaminantes são eluídas primeiro durante a lavagem da coluna, sem que ocorram perdas

significativas da proteína recombinante. O resultado final é a obtenção de um produto concentrado e com alto grau de pureza.

O fato da maior parte da proteína expressa estar em corpúsculos de inclusão também auxilia o processo de purificação, uma vez que com o rompimento celular estes são facilmente solubilizados em tampão de solubilização. Sendo assim, é obtida uma fração livre da maior parte das proteínas contaminantes provenientes da *E. coli*. As etapas do processo são resumidas na FIGURA 12.

4.3.1 CULTIVO DA *E. coli* BL21 TRANSFECTADA

A produção da proteína recombinante para posterior purificação foi realizada em Erlenmeyers de dois litros com um litro de meio LB com antibióticos.

Um criotubo do banco de células foi descongelado e inoculado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo seletivo (Cloranfenicol 25 mg/L e Ampicilina 100 mg/L), incubado em agitador rotativo a 37°C, 180 rpm por 15 horas, para a obtenção do pré-inóculo.

Esse pré-inóculo foi adicionado a 900 mL de meio de cultivo seletivo (Cloranfenicol 25 mg/L e Ampicilina 100 mg/L), incubado em agitador rotativo a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), 180 rpm e sua absorbância foi monitorada a cada hora por espectrofotômetro a 600 nm. Para zerar o espectrofotômetro, foi utilizado meio LB.

Quando o cultivo atingiu absorbância de 0,8 foi adicionado o indutor de expressão (IPTG 0,3 mM) e a fermentação foi conduzida por mais 3 horas (conforme tópico 4.2.5.1). Uma alíquota de 2 mL foi armazenada para aplicar em gel SDS-PAGE, conforme descrito no tópico 4.2.5.1.

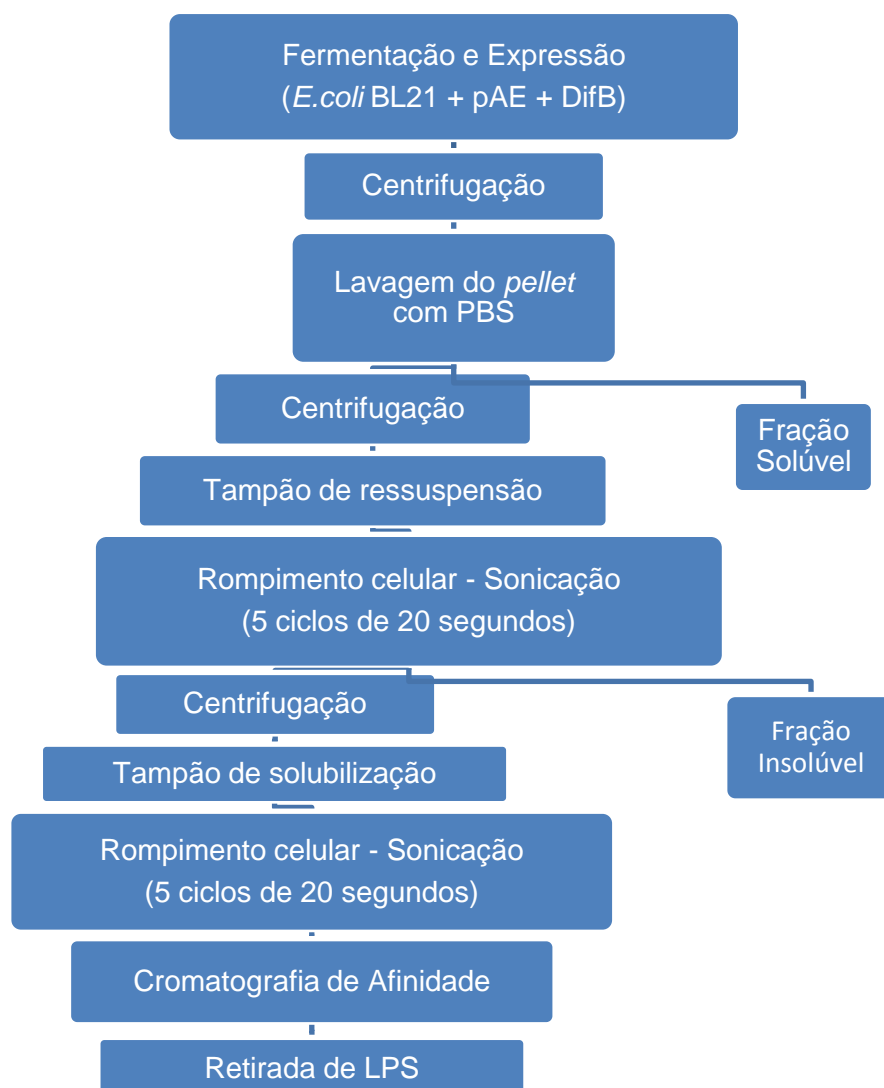


FIGURA 12 – ETAPAS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

4.3.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA - PRÉ-COLUNA

Para a realização da cromatografia e purificação da proteína, algumas etapas de pré-coluna são necessárias. No fluxograma (FIGURA 12) são dadas as sequências das etapas. Desta forma, o cultivo induzido (tópico 4.3.1) foi centrifugado a 5.000 g, 4°C por 10 minutos para a sedimentação da biomassa. Para a retirada de restos de meio de cultivo presente no *pellet*, o sedimento celular foi ressuspenso em PBS pH

7,2 esterilizado e novamente centrifugado nas mesmas condições. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes. O sedimento celular obtido foi armazenado a 4°C no próprio frasco de centrifuga (500 mL) até a próxima etapa de purificação.

Depois de lavado, o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de tampão fosfato (20 mM Na₂HPO₄, pH 8,0) passou por quatro ciclos de sonicação de 20 segundos, com o mesmo tempo de intervalo em banho de gelo. Em seguida, o tubo contendo o material lisado foi centrifugado a 15.000 *g* e 4°C por 10 minutos para a precipitação de corpúsculos de inclusão.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de tampão de solubilização (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 6 M de ureia, pH 8,0) e um novo ciclo de sonicação e centrifugação foi realizado. O sobrenadante obtido foi armazenado a 4°C e foi denominado de fração clarificada. Uma alíquota de 2 mL foi armazenada para aplicar em gel SDS-PAGE, conforme descrito no tópico 4.2.5.1.

4.3.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Utilizou-se uma coluna pré-empacotada HisTrap FFTM 5 mL (GE HealthcareTM), com resina de níquel, que possui afinidade pela cauda de poli-histidina presente na proteína recombinante.

A purificação foi realizada em sistema automatizado ÄKTA purifier 100 GE HealthcareTM. Os protocolos foram adaptados segundo recomendações do fabricante, com o fluxo de 5 mL/min. O equilíbrio da coluna foi feito com 5 volumes de coluna (VC) do tampão de ligação. Em seguida, a fração clarificada foi injetada (25 mL) e a coluna foi lavada com o tampão de ligação até que a absorbância em 280 nm alcançasse a linha de base novamente. A eluição foi realizada utilizando imidazol 500 mM por ter maior afinidade com o níquel que a calda de poli-histidina. Desta forma, o imidazol desliga a proteína recombinante da resina de uma só vez, concentrando a proteína. Todos os tampões utilizados na purificação continham ureia para garantir que a proteína recombinante estivesse solubilizada e não precipitasse na coluna.

Para evitar a presença de contaminantes, um gradiente de eluição foi realizado com 5 VC entre o tampão de ligação e o tampão de eluição. As frações coletadas e

analisadas foram: não ligado, lavagem (15 mL/cada) e eluição (5 mL/cada). As etapas da cromatografia estão descritas na TABELA 5.

Após a cromatografia, 150 µL de cada fração foram mantidos a -80°C para posterior dosagem do teor de proteína total (BRADFORD, 1976) e análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE (tópico 4.2.5.1).

TABELA 5 – ETAPAS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Etapa	Tampão utilizado	Volume	Composição	Amostras coletadas
Equilíbrio da coluna	Tampão de ligação	5VC	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM cloreto de sódio, 6 M ureia, 5mM imidazol, Ditioneitol (DTT) 2mM pH 7.4	NA
Injeção da amostra	Tampão de ligação	25 mL	Tampão de ligação – 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM cloreto de sódio, 6 M ureia, 5 mM imidazol, Ditioneitol (DTT) 2mM pH 7.4	NL – não ligado
Lavagem da coluna	Tampão de ligação	Até que a absorbância em 280 nm alcançasse a linha de base novamente	Tampão de ligação – 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM cloreto de sódio, 6 M ureia, 5 mM imidazol, Ditioneitol (DTT) 2mM pH 7.4	L1 e L2 – Lavado 1 e Lavado 2
Eluição	Gradiente entre o tampão de ligação e de eluição	5 VC	Tampão de eluição – 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl, 6 M ureia, 500 mM imidazol, Ditioneitol (DTT) 2mM pH 8.0	E1 a E8 – Eluição coletados de 5 em 5 mL

FONTE: o Autor (2014).

4.3.4 REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS COM TRITON X-114

A remoção de endotoxinas (lipopolissacarídeos, LPS) foi realizada utilizando-se o detergente Triton X-114, detergente catiônico, na concentração de 1% v/v. Após a adição do detergente a amostra foi incubada a 4°C por 30 minutos, levada ao banho-maria a 37°C por 10 minutos e centrifugada a 20.000 g 15 minutos 4°C. A fase aquosa, contendo a proteína recombinante foi removida e armazenada em novo tubo. Este processo foi repetido duas vezes. Nova dosagem da proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976), conforme tópico 4.3.5.

4.3.5 DOSAGEM DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A concentração de proteína foi dosada pelo método Bradford, (1976). A metodologia aplicada foi baseada no protocolo do fabricante (Sigma). As leituras das microplacas de fundo em U foram realizadas no leitor de ELISA (Epoch biotec modelo 1303016). A curva padrão foi realizada com albumina (Sigma na concentração de 0,02 mg/mL).

4.4 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO COM INSERTO E DA PROTEÍNA DE INTERESSE

4.4.1 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL E INSERTO

Ambas as fitas (*forward* e *reverse*) do inserto (sequência de DNA da subunidade B da toxina diftérica) foram sequenciadas no equipamento ABI PRISM-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados obtidos foram comparados com sequências em banco de dados BLAST (NCBI) para confirmar que o fragmento correto foi amplificado.

4.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A banda de proteína obtida por gel SDS-PAGE foi digerida com tripsina (Promega) pelo método adaptado de Shevchenko *et al.* (1996). Após incubação a 37°C/20 horas, a amostra hidrolisada foi misturada numa solução matriz HCCA —*α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid, e pipetada na placa de MALDI onde permaneceram até completa secagem em temperatura ambiente. O espectro de massa (MS) foi adquirido utilizando o espectrofotômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker

Daltonics, Alemanha). Picos foram analisados com o *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

5 RESULTADOS

5.1 CLONAGEM DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA POR PCR

5.1.1 CULTIVO DO *C. diphtheriae* PARA EXTRAÇÃO DE DNA

O cultivo de *C. diphtheriae* foi realizado por 72 horas para o crescimento da bactéria. Na coloração de Gram foram visualizados bacilos Gram positivos em forma de clava com arranjos que lembram letras chinesas confirmando o aspecto característico de *C. diphtheriae*. Também foi possível observar que o cultivo se apresentava livre de outros microrganismos contaminantes (FIGURA13).

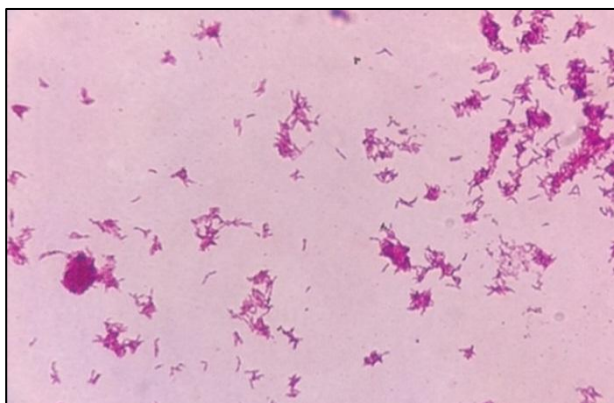


FIGURA 13 – FOTOMICROGRAFIA DO CULTIVO DE *C. diphtheriae*.
FONTE: o autor.

A qualidade do DNA extraído de *C. diphtheriae* está representada na eletroforese em gel de a 1% (FIGURA 14).

A absorbância em 260 e 280 nm, assim como a relação 260/280 nm, do DNA extraído estão representadas na TABELA 6. A concentração de DNA obtida, calculada pela fórmula descrita no tópico 4.1.2, foi de 270 µg/mL e a pureza obtida foi de 60%.

TABELA 6 – TABELA DA ABSORBANCIA, CONCENTRAÇÃO E PUREZA DE DNA.

	Abs ₂₈₀ (1:50)	Abs ₂₆₀ (1:50)	DNA] (µg/mL)	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀
<i>C. diphtheriae</i>	0,178	0,108	270 µg/mL	0,607

FONTE: o autor (2014).

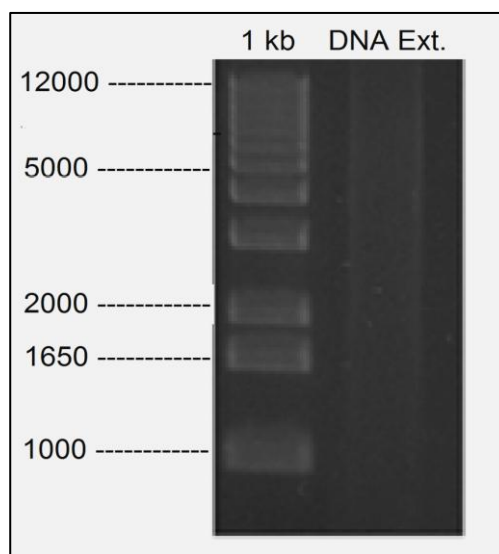


FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DA EXTRAÇÃO DO DNA DO *C. diphtheriae*. LEGENDA: COLUNA 1 - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR DE 1 KB; COLUNA 2 - DNA EXTRAÍDO DO MICRORGANISMO.

FONTE: o autor (2014).

Os produtos de PCR (FIGURA 15) ficaram entre os marcadores de massa molecular de 1636 e 1018, ou seja próximo a 1018pb.

O desenho dos *primers* e a reação de PCR resultaram na obtenção da sequência de interesse com alto grau de pureza. Conforme observado na eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, não foi evidenciada a amplificação de sequências inespecíficas por apresentar somente uma banda, na região entre 1018 e 1636pb, indicativo de que se trata da sequência de interesse (1046pb).

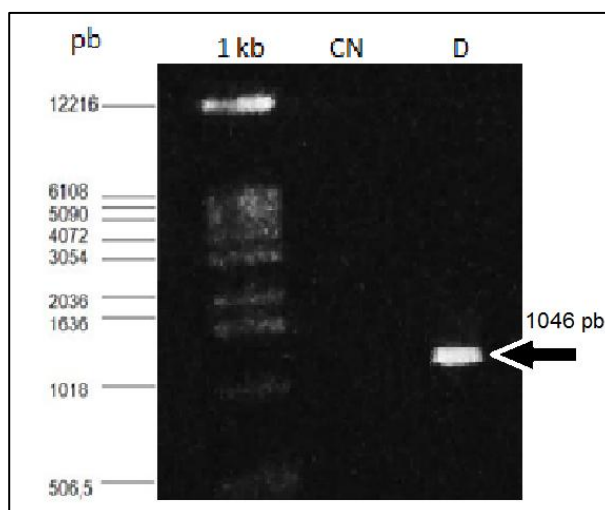


FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR. A SETA INDICADA O FRAGMENTO CLONADO POR PCR. Legenda: 1kb – marcado de massa molecular, CN – controle negativo, D – DNA extraído da difteria.
FONTE: o autor (2014).

5.2 TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

5.2.1 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES E PREPARO DO PLASMÍDEO

Na busca de clones transformados (contendo o plasmídeo pAE) obteve-se a 18 colônias, nominadas de pAE 1 a pAE 18. Nove delas foram escolhidas para análise, por eletroforese em gel de agarose, visando verificar a presença do plasmídeo (FIGURA 16). A colônia de número 11 (indicada pela seta) foi escolhida aleatoriamente para o cultivo e extração do plasmídeo pAE. As demais colônias foram congeladas.

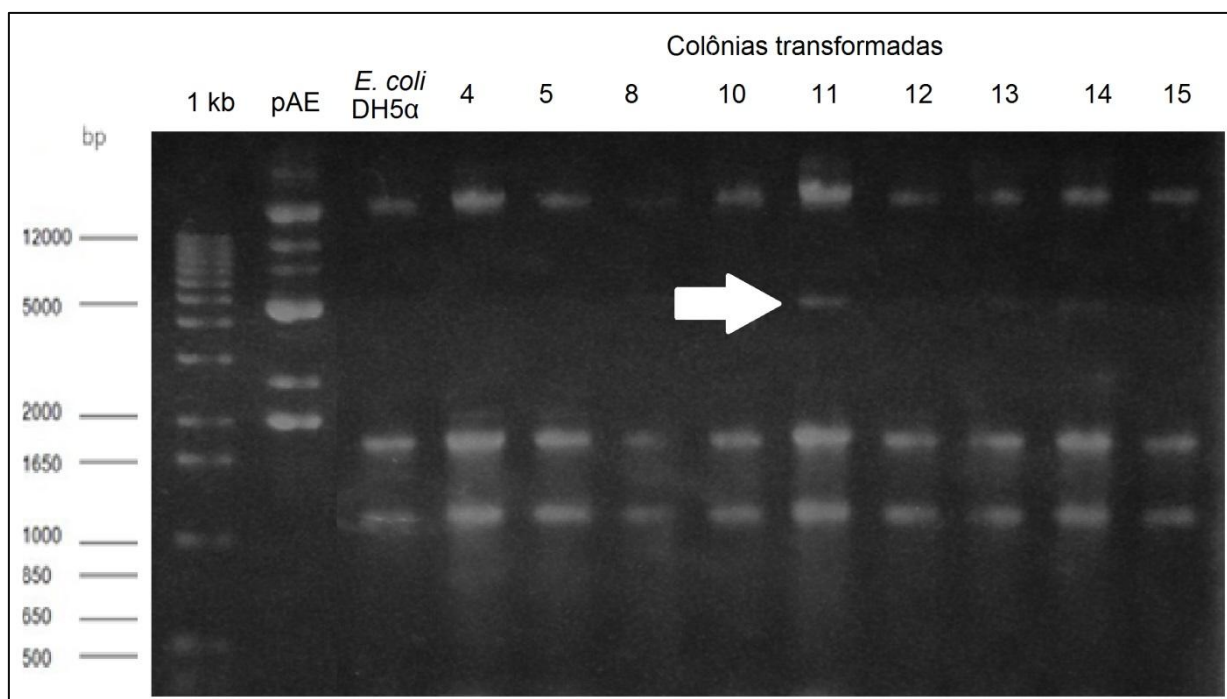


FIGURA 16 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO *SCREENING* DAS COLÔNIAS COM O PLASMÍDEO INSERIDO. A SETA INDICA A PRESENÇA DE PLASMÍDEO.

FONTE: o autor (2014).

O protocolo de choque térmico mostrou-se eficiente na inserção do plasmídeo na célula hospedeira (FIGURA 16). Apresentou apenas uma banda de 3000 pb, utilizado como controle positivo no gel.

O produto de digestão do plasmídeo com as duas enzimas de restrição (*Bam*HI e *Hind*III) (FIGURA 17) apresentou aproximadamente 3000 pares de base. A diferença de migração entre as amostras pAE (circular) e pAE B e pAE B/H (digeridos) é devida a diferença de conformação. A sequência excluída é muito pequena não sendo significativa para alterar o padrão de migração do plasmídeo

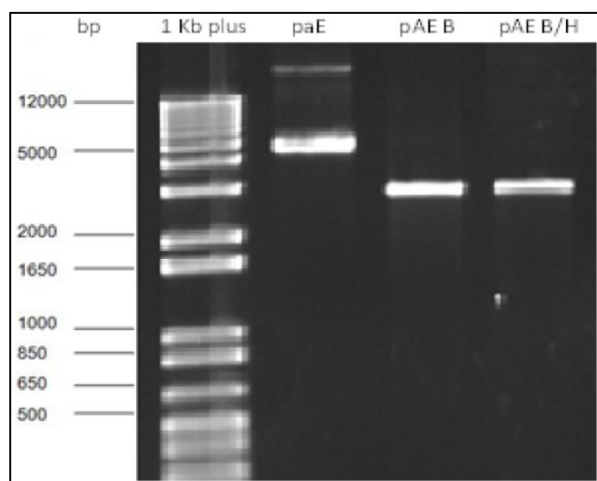


FIGURA 17 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pAE COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Bam*HI e *Hind*III.

LEGENDA: 1KB PLUS – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR DE 1kb; pAE – PLASMÍDEO CLONADO E CONTROLE NEGATIVO DA DIGESTÃO; pAE B – PLASMÍDEO DIGERIDO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI; pAE B/H – PLASMÍDEO DIGERIDO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Bam*HI E *Hind*III.

FONTE: o autor (2014).

A digestão do gene clonado por PCR da subunidade B da toxina diftérica, quando analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, apresentou uma sequência de aproximadamente 1000 pares de bases (FIGURA 18). As bandas da sequência amplificadas já digeridas estão circundadas por um retângulo.

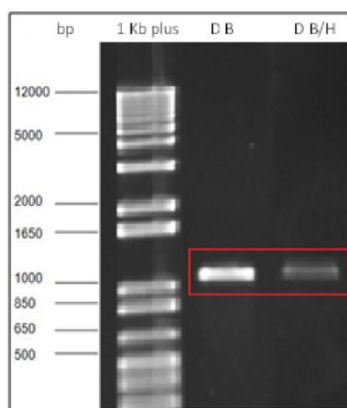


FIGURA 178 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA DIGESTÃO DO GENE DA SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA PELAS ENZIMAS *Bam*HI e *Hind*III.

LEGENDA: 1 kb PLUS – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; DB – PRODUTO DE PCR DIGERIDO PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI; D B/H – PRODUTO DE PCR DIGERIDO PELA ENZIMA DE *Bam*HI e *Hind*III.

FONTE: o autor (2014).

As eletroforeses após da digestão do plasmídeo pAE e do gene da subunidade B da toxina diftérica apresentam somente uma banda para cada amostra (FIGURAS

17 e 18). A presença de somente uma banda indica que o DNA está livre de contaminantes e na forma linear, não apresentando diferentes conformações (LEMMENS *et al.*, 2003).

5.2.2 CLONAGEM DO PLASMÍDEO pAE LIGADO A SUBUNIDADE B DA TOXINA DIFTÉRICA

Após transformação de *E. coli*, 100uL do cultivo foram semeados na placa de Petri e cresceram seis colônias transformadas com o plasmídeo e o inserto.

Na eletroforese em gel de agarose a 1% do *screening* das colônias contendo o plasmídeo pAE e o inserto (FIGURA 19), observou-se que todas as colônias de *E. coli* BL21 transfectadas (Dif1 a Dif6) apresentaram o mesmo perfil: uma banda próxima de 3.000 pb indicativo do plasmídeo contendo o inserto. No controle negativo (CN, *E. coli* BL21) esta banda não aparece, evidenciando a eficácia da transfecção. A colônia três foi escolhida, de forma aleatória, para a extração do plasmídeo.

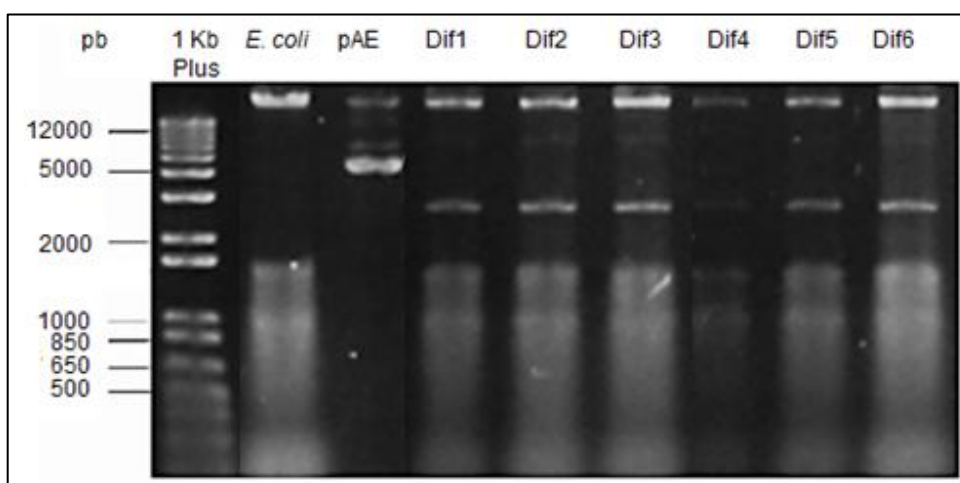


FIGURA 19 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO *SCREENING* DAS COLÔNIAS APÓS TRANSFORMAÇÃO. LEGENDA: 1 KB PLUS - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; *E. coli* - O DNA EXTRAÍDO DE *E. coli* SEM pAE; pAE - PLASMÍDEO SEM INSERTO EXTRAÍDO E PURIFICADO; D1 AO D6 - O DNA EXTRAÍDO DAS SEIS COLÔNIAS QUE CRESCERAM EM PLACAS COM MEIO LB SELETIVA APÓS TRANSFECÇÃO COM pAE E INSERTO.

FONTE: o autor (2014).

5.2.3 REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO PLASMÍDEO E O INSERTO

A eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão do plasmídeo pAE com inserto, das colônias nominadas Dif 3 e Dif 6 (obtidas no tópico 5.2.2) apresentaram uma banda de 1046pb FIGURA 20 - seta indica o produto esperado). Os trabalhos foram então conduzidos utilizando-se o plasmídeo da colônia Dif 3 para os cultivos da bactéria, assim com a expressão da proteína recombinante.

A dupla digestão realizada com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III para o plasmídeo pAE e para o inserto (subunidade B da toxina diftérica) não apresentou qualquer modificação no padrão de migração do DNA, porque somente alguns pares de bases foram retirados das sequências. Com a digestão do plasmídeo pAE, observou-se somente uma banda na região de aproximadamente 3.000pb, evidenciando que o plasmídeo se encontrava na forma linear.

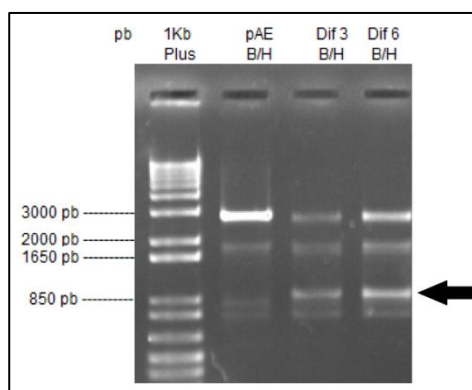


FIGURA 20 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA DUPLA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO COM AS ENZIMAS *Bam*HI E *Hind*III EXTRAÍDO E PURIFICADO DAS COLONIAS OBTIDAS NO SCREENING DA TRANSFEÇÃO.

LEGENDA: 1KB PLUS = MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; PAE B / H = VETOR APÓS A DIGESTÃO COM *bam*HI E *hind*III; DIF 3 B / H = PLASMÍDEO DIGERIDO COM *bam*HI E *hind*III; DIF 6 B / H = PLASMÍDEO DIGERIDO COM *bam*HI E *hind*III.

FONTE: o autor (2014).

5.2.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

5.2.4.1 CULTIVO DE *E. coli* BL21 TRANSFORMADA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Uma banda de superexpressão com cerca de aproximadamente 40k Da foi observada na amostra induzida (FIGURA 21). As frações da proteína obtida foram nominadas de Dif ni, para o cultivo não induzido e Dif i para o cultivo induzido.

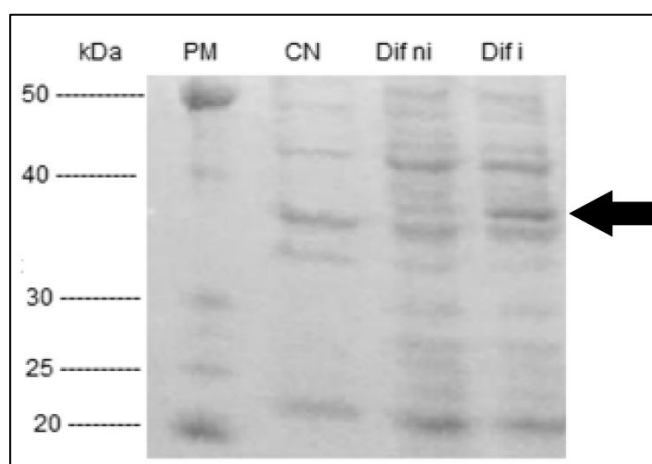


FIGURA 181 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

LEGENDA: PM - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; CN - CONTROLE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE; DIF NI - CULTIVO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS ANTES DA INDUÇÃO; DIF I - AMOSTRA PROVENIENTE DO CULTIVO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS APÓS A INDUÇÃO.

FONTE: o autor (2014).

A banda de superexpressão próxima de 40 kDa, é indicativo de que a subunidade B da toxina diftérica está sendo expressa, pois a mesma tem 37 kDa. Foi verificada uma banda de menor intensidade da proteína recombinante na fração não induzida, o que sugere que a proteína está sendo expressa antes da indução, todavia, com baixa intensidade.

5.2.4.2 TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA

O teste de solubilidade da proteína evidenciou a presença de uma banda correspondente à proteína recombinante em ambas as frações, solúvel (sobrenadante) e insolúvel (biomassa) (FIGURA 22).

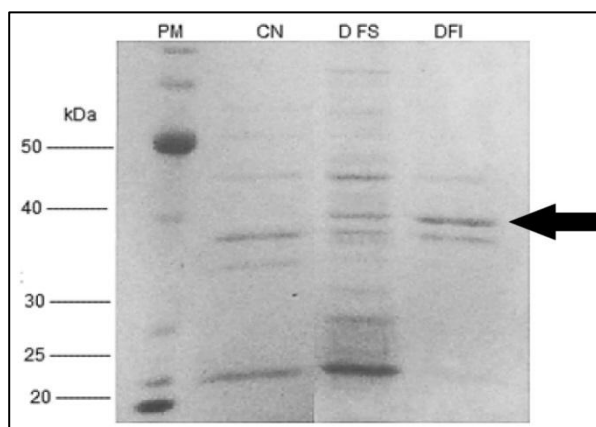


FIGURA 22 – GEL SDS-PAGE DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.
 LEGENDA: PM - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; CN - FRAÇÃO INSOLÚVEL DO CONTROLE NEGATIVO; D SF - FRAÇÃO SOLÚVEL DE CÉLULAS RECOMBINANTES; D IF - FRAÇÃO INSOLÚVEL DE CÉLULAS RECOMBINANTES.
 FONTE: o autor (2014).

Foi realizado um teste com o sobrenadante do meio de cultivo (Gel SDS-PAGE - dados não mostrados) para a verificação da secreção da proteína para o meio. O resultado foi negativo, sugerindo que a proteína está sendo expressa em corpúsculos de inclusão, característica na expressão heteróloga de *E. coli*. Desta forma, a maior quantidade de proteína expressa se apresenta na forma insolúvel. A fração solúvel geralmente possui uma quantidade maior de proteínas contaminantes provenientes da *E. coli*. Quando a proteína é expressa em corpúsculos de inclusão, a toxicidade para as células é menor, a proteína fica protegida das proteinases da célula hospedeira e estes corpúsculos são facilmente precipitados por centrifugação, constituindo agregados praticamente livres de contaminantes da proteína superexpressa (SAMBROOK, 2001; TERPE, 2006; GHOLIPOUR *et al.*, 2010).

CHOIN *et al.* (2006) desenvolveram um sistema de produção de proteínas recombinantes de alto rendimento. Os autores afirmam que as proteínas superexpressas e produzidas sob a forma de corpúsculos de inclusão, apresentam diversas

vantagens. Dentre estas estão os altos níveis de acúmulo da proteína recombinante, que são mais elevados (maior do que 25% das proteínas totais) quando comparadas com as proteínas solúveis. Os corpúsculos de inclusão podem ser inicialmente isolados em um estado altamente purificado e concentrados por centrifugação simples, diminuindo as etapas de *downstream* para a remoção de proteínas contaminantes da célula hospedeira. Por estas vantagens apontadas acima, a fração insolúvel foi escolhida para a realização da purificação nas etapas seguintes.

5.2.4.3 RECONHECIMENTO DA PROTEÍNA COM ANTICORPOS ANTI-HIS6

Na FIGURA 23 é apresentado o resultado da reação de Western-Blot utilizando anticorpos anti-His6. A confirmação da expressão da proteína foi verificada nesta etapa apresentando somente uma banda, sem reações inespecíficas. Este teste é confirmatório para a presença da cauda de poli-histidina, inserida para a realização da etapa de purificação por cromatografia de afinidade por coluna de níquel.

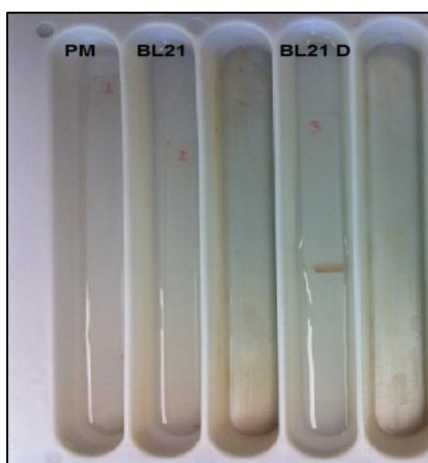


FIGURA 2319 – WESTERN BLOT DA FRAÇÃO INSOLÚVEL CONTRA ANTICORPOS ANTI-HIS 6.
FONTE: o autor (2014).

5.2.4.4 CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS

A curva de crescimento das células *E. coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pAE com o gene da subunidade B da toxina diftérica está demonstrada na FIGURA 24 (Gráfico da concentração celular (g/L) x tempo de cultivo). No tempo de cinco horas, a absorbância do cultivo da *E. coli* BL21 recombinante (D3) foi de 0,650, indicativo da fase exponencial do cultivo, e por isso, o indutor (IPTG) foi adicionado. As setas no gráfico indicam a adição de IPTG.

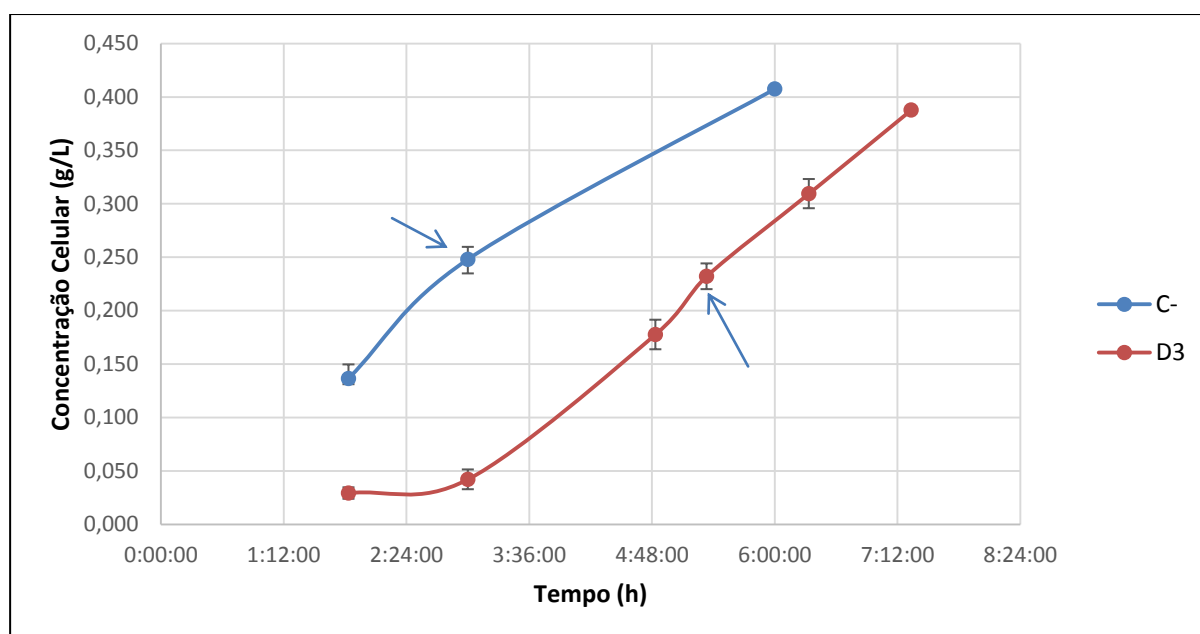


FIGURA 24 – CURVA DE CRESCIMENTO DA *E.coli* BL 21 TRANSFECTADA (CONCENTRAÇÃO CELULAR (g/L) X TEMPO (h)).

LEGENDA: C- É O CONTROLE NEGATIVO. D3. - A BACTERIA TRANSFECTADA COM O PLASMÍDEO + INSERTO.

FONTE: o autor (2014).

Para o cultivo da célula *E. coli* BL21 pLysS (C -) não foi observada a fase lag. Para o cultivo das células de *E. coli* BL21 pLysS transfectadas a fase lag foi verificada até a terceira hora de cultivo. Após 5 horas de cultivo a absorbância atingiu valor de 0,650 quando foi realizada a indução. Após a adição do IPTG no cultivo houve um decréscimo celular, pelo desvio do metabolismo para a super expressão da proteína recombinante, gerando *stress* celular e redução do seu crescimento (KIM, SEO, CHA,

2003; GOPAL, KUMAR, 2013). O cultivo foi interrompido porque a produção máxima de proteínas foi evidenciada no tempo de 2 horas, com pouca diferença para períodos superiores.

As velocidades de crescimento foram de $0,488 \text{ h}^{-1}$ no tempo 0 a 3 horas (fase Lag), $0,721 \text{ h}^{-1}$ no tempo 3 a 6 horas (fase exponencial) e $0,236 \text{ h}^{-1}$ de 6 a 8 horas (após a indução com IPTG) (FIGURA 25). O controle negativo atingiu aproximadamente 0,410 g/L e o cultivo recombinante 0,360 g/L ao final do tempo de cultivo.

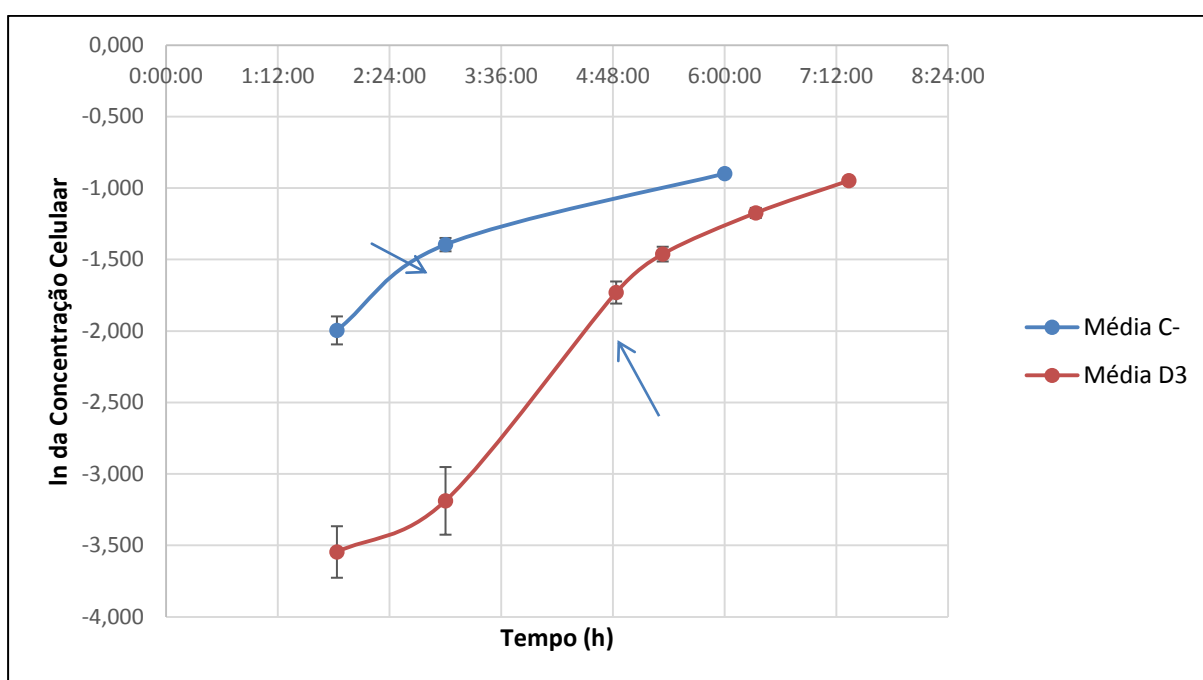


FIGURA 25 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DA *E.coli* BL 21 TRANSFORMADAS.
 LEGENDA: C- É O CONTROLE NEGATIVO. D3 A BACTÉRIA TRANSFORMADA.
 FONTE: o autor (2014).

A análise da expressão de proteínas por gel SDS-PAGE está indicada na FIGURA 26. Foi possível observar o aumento da produção de proteína, de acordo com o tempo de coleta, após a indução. A banda da proteína recombinante está indicada pela seta.

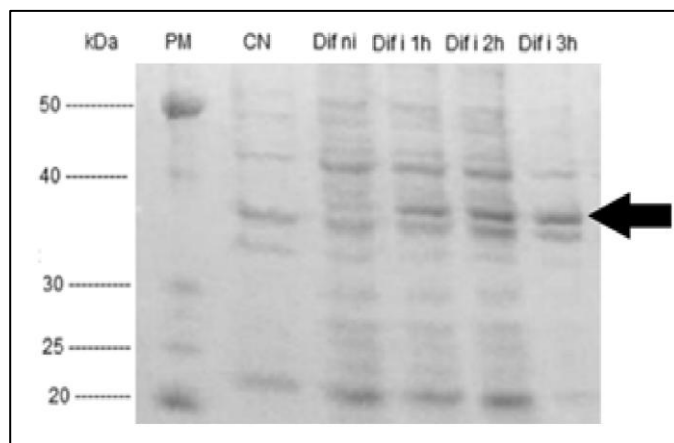


FIGURA 26 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INDUÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

LEGENDA: PM - MARCADOR MASSA MOLECULAR; CN - CONTROLE NEGATIVO; DIF NI - PERFIL DE PROTEÍNAS ANTES DA INDUÇÃO; DIFI 1H a DIFI 3H - PERFIL DE PROTEÍNA APÓS 1 HORA, 2H E 3 H DE INDUÇÃO, RESPECTIVAMENTE.

FONTE: o autor (2014).

A maior expressão da proteína recombinante foi atingida em três horas após a indução com IPTG e não houve diferenciação da expressão das outras proteínas presentes no cultivo.

5.2.4.5 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Os resultados de todos os experimentos de indução das frações solúvel e insolúvel foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE (FIGURA 28 e 29). As bandas da proteína recombinante estão apontadas por uma seta.

Na fração solúvel (FIGURA 27), é possível observar que nas condições testadas existe uma grande variação na expressão da proteína. Os experimentos 5, 10 e 11 (31°C, 0,5 mM de IPTG e 3 h) são que apresentam maior concentração da proteína recombinante (37k Da). As outras bandas presentes no gel são provenientes de proteínas da célula hospedeira, uma vez que se trata da biomassa sonicada.

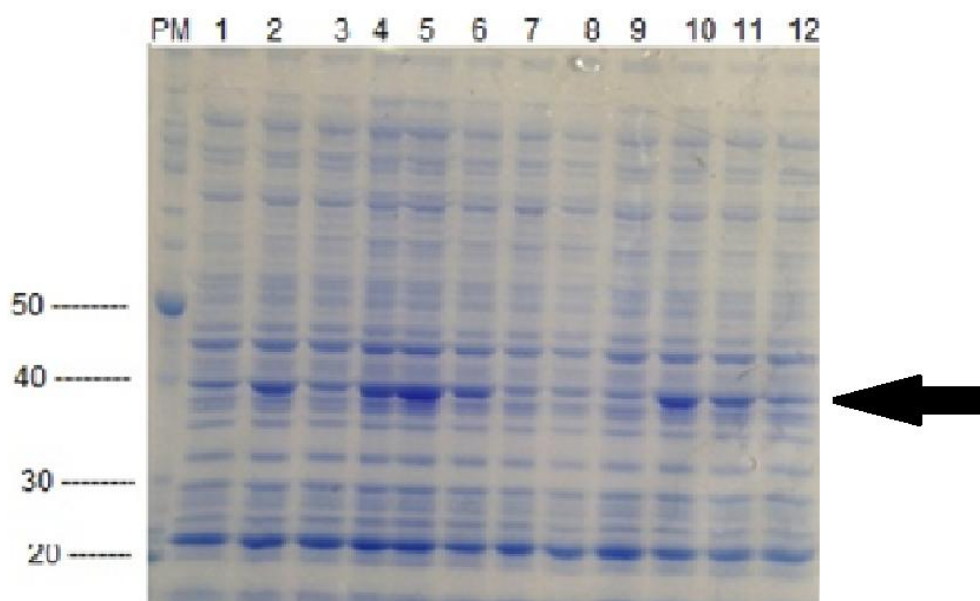


FIGURA 27 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (37 kDa).
FONTE: o autor (2014).

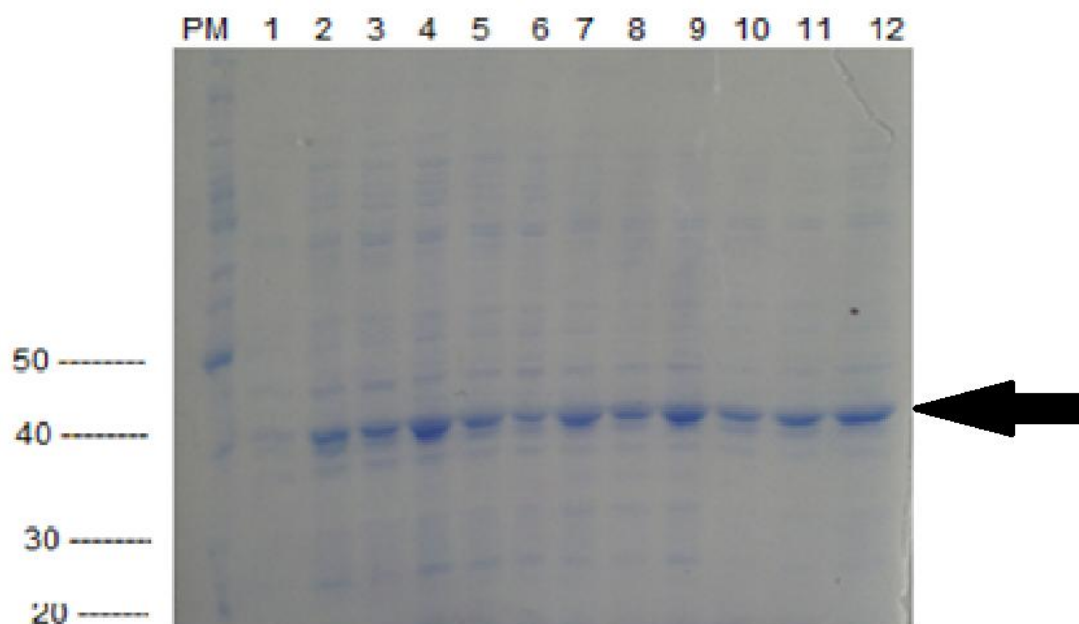


FIGURA 20 – GEL SDS-PAGE DA EXPRESSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.
FONTE: o autor (2014).

Em todos os experimentos do planejamento experimental (FIGURA 28), verificou-se pouca ou nenhuma variação na produção da proteína recombinante.

Nesta fração observou-se menor intensidade nas bandas de proteínas provenientes do cultivo, por que a grande maioria das proteínas presentes da *E. coli* são solúveis.

A avaliação pelo *software* Image J mostrou que para a fração solúvel as maiores respostas foram para os experimentos 5, 10 e 11 (31°C, 0,5 mM de IPTG e 3 h) e para a fração insolúvel, pouca variação foi observada.

A análise estatística da TABELA 7 gerou o gráfico de contorno, o diagrama de Pareto e a análise da variância (ANOVA) para cada uma das frações (solúvel e insolúvel da proteína recombinante). Nesta análise, a significância das condições testadas foi obtida através do p-valor. O p-valor pode ser considerado como o menor valor do nível de significância para o qual rejeitamos a hipótese de que não há diferença significativa entre os níveis dos fatores, ou seja, se o nível de significância proposto para o teste for menor que o p-valor a hipótese não deve ser rejeitada, então existe diferença significativa para o nível especificado.

TABELA 7 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE IPTG, TEMPERATURA E TEMPO DE INDUÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Experimento	Temperatura °C	IPTG mM	Tempo de Indução (h)	Fração Solúvel	Fração Insolúvel
1	25	0,1	2	2099698	491678
2	25	0,5	4	2523870	1705577
3	25	0,9	3	1845870	1943406
4	31	0,1	4h	3662062	6345497
5	31	0,5	3h	4945891	2391820
6	31	0,9	2h	3198648	2391355
7	37	0,1	3h	910506	3951891
8	37	0,5	2h	770092	1916234
9	37	0,9	4h	1168335	3013062
10 (C)	31	0,5	3h	4267770	1539870
11 (C)	31	0,5	3h	4189062	1658284
12 (C)	31	0,5	3h	3029406	1714284

FONTE: o autor (2014).

O diagrama de Pareto (FIGURA 29) mostra o efeito dos fatores estudados como a concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução sobre a expressão da proteína recombinante na sua fração solúvel. A fração solúvel apresentou a temperatura na função quadrática como estatisticamente significativa dentro das condições testadas, com o p-valor abaixo de 0,05.

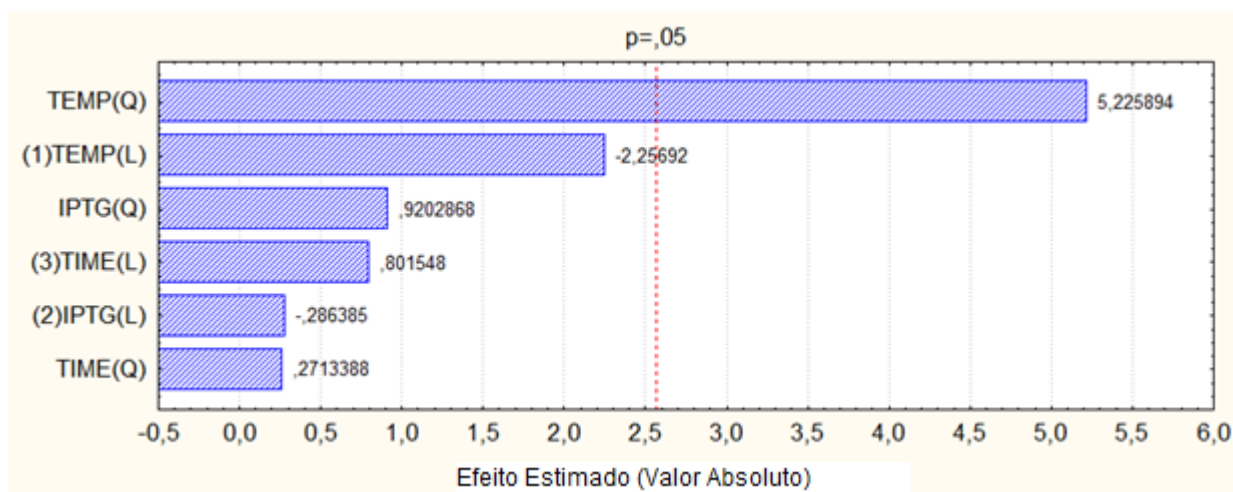


FIGURA 29 – DIAGRAMA DE PARETO COM AS CONDIÇÕES DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO SOLÚVEL.

LEGENDA: TEMP – TEMPERATURA, IPTG – INDUTOR, TIME – TEMPO.

FONTE: o autor (2014).

A TABELA 8 está a análise da variância com os valores do p-valor calculados pelo programa Statistica 5.0 para a fração solúvel.

TABELA 8 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A FRAÇÃO SOLÚVEL.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
(1)Temperatura (L)	2,18E+12	1	2,18E+12	5,093672	0,073636
Temperatura (Q)	1,17E+13	1	1,17E+13	27,30997	0,003393
(2)IPTG (L)	3,52E+10	1	3,52E+10	0,082016	0,786071
IPTG(Q)	3,63E+11	1	3,63E+11	0,846928	0,399647
(3)Tempo (L)	2,76E+11	1	2,76E+11	0,642479	0,459196
Tempo(Q)	3,16E+10	1	3,16E+10	0,073625	0,796977
(1)Temperatura L+Q	1,39E+13	2	6,95E+12	16,20182	0,006533
(2)IPTG L+Q	3,98E+11	2	1,99E+11	0,464472	0,653103
(3)Tempo L+Q	3,07E+11	2	1,54E+11	0,358052	0,715607

LEGENDA: F – RAZÃO ENTRE A VARIABILIDADE DAS AMOSTRAS E A VARIABILIDADE DENTRO DA AMOSTRA, P – NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA NO INTERVALO DE PROBABILIDADE ESCOLHIDO (5%).

Na análise da variância do experimento, modelo polinomial de 2º ordem, (FIGURA 29) pode-se verificar pela avaliação do p-valor ($\alpha = 0,05$) que não houve diferença significativa para os fatores em 1º ordem e para dois fatores em 2º ordem, mas apresentou diferença significativa para o fator temperatura de 2º ordem. Desta forma, a temperatura influencia positivamente o cultivo, ou seja, quanto maior a

temperatura, melhor será a expressão de proteínas. O R^2 para a fração solúvel foi de 0,799.

Na FIGURA 30 está gráfico de contorno das superfícies que é confirmatório para a observação acima. O único fator testado que influencia a produção de proteínas recombinantes pelo cultivo é a temperatura e de forma positiva.

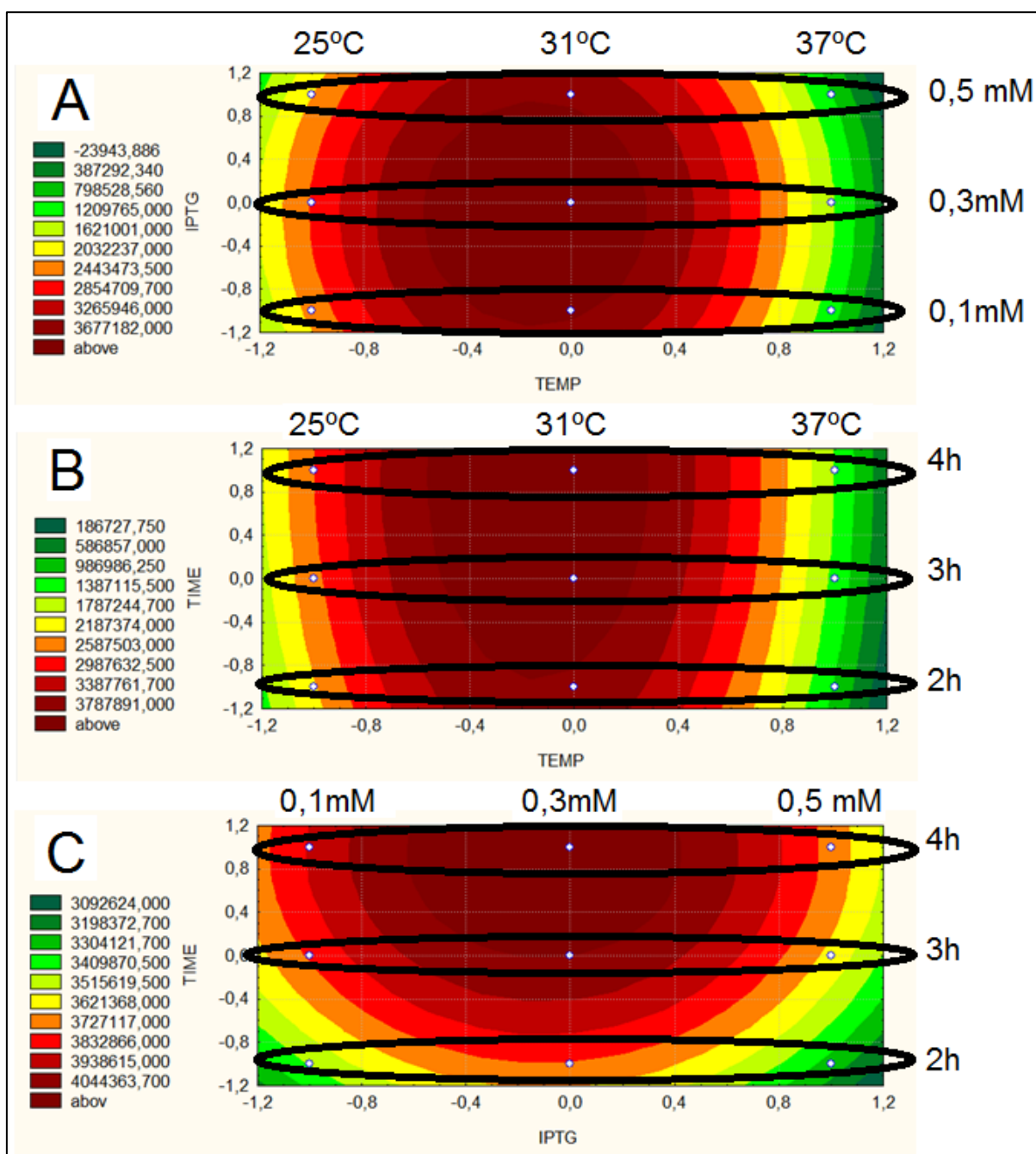


FIGURA 30 – GRÁFICOS DE CONTORNOS DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO SOLÚVEL.

FONTE: o autor (2014).

Pode-se observar que a temperatura nos níveis testados, -1 e +1 ou para o ponto central apresenta resposta estatisticamente diferente, dentro do grau de confiança. As respostas nos níveis -1 e +1 são iguais, mas diferentes do ponto central. Assim, a temperatura apresentou variância dentro das condições testadas, sendo a condição ótima próxima do ponto central (gráfico de contorno A - FIGURA 30). A superfície de resposta da fração solúvel confirma o diagrama de Pareto e a análise da variância, pois as variáveis tempo e concentração de IPTG não são estatisticamente significativas, pois quando analisadas (linearmente L ou de forma quadrática Q), os valores de p foram todos superiores a 0,05. A melhor condição de cultivo foi detectada no ponto central do experimento, ou seja, com temperatura de 31°C, concentração de IPTG de 0,5 mM de IPTG e tempo de 3 h.

O diagrama de Pareto (FIGURA 31) e a análise da variância (TABELA 9) mostram que para a fração insolúvel da proteína nas condições testadas, nenhuma das condições apresentou significância estatística. Para nenhum dos fatores o p-valor foi abaixo de 0,05. O R^2 obtido para a fração insolúvel foi de 0,899. A análise da variância confirma essa observação. Assim, produção de proteínas na forma de corpúsculos de inclusão, não é afetada por nenhuma das variáveis na faixa testada.

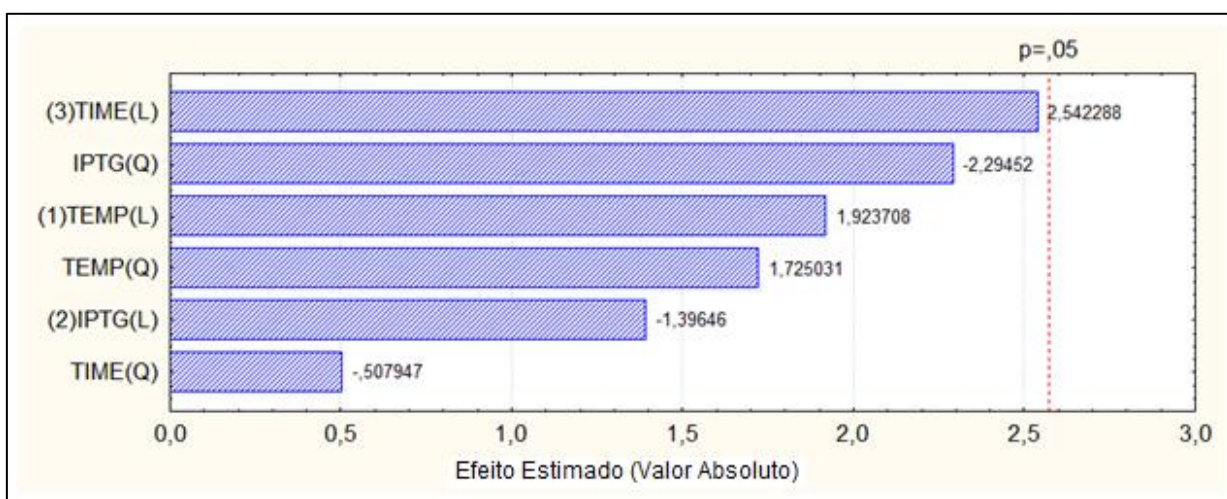


FIGURA 31 – DIAGRAMA DE PARETO COM AS CONDIÇÕES DAS FERMENTAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO INSOLÚVEL.
FONTE: o autor (2014).

TABELA 9 - TABELA ANOVA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA FRAÇÃO INSOLÚVEL.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
(1)Temperatura (L)	3,75E+12	1	3,75E+12	3,700653	0,112393
Temperatura (Q)	3,01E+12	1	3,01E+12	2,97573	0,145118
(2)IPTG (L)	1,97E+12	1	1,97E+12	1,950096	0,221403
IPTG(Q)	5,33E+12	1	5,33E+12	5,264819	0,070252
(3)Tempo (L)	6,54E+12	1	6,54E+12	6,463226	0,051749
Tempo(Q)	2,61E+11	1	2,61E+11	0,25801	0,633099
(1)Temperatura L+Q	6,76E+12	2	3,38E+12	3,338192	0,119993
(2)IPTG L+Q	7,3E+12	2	3,65E+12	3,607458	0,107201
(3)Tempo L+Q	6,8E+12	2	3,4E+12	3,360618	0,118848

5.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

5.3.1 CULTIVO DA *E. coli* BL21 TRANSFECTADA, ETAPAS PRÉ-PURIFICAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Na etapa pré-coluna verificou-se grande quantidade de proteína expressa com aproximadamente 40 kDa, confirmando o sucesso da expressão pois a sequência de interesse possui 37kDa (FIGURA 32 - indicado pela seta).

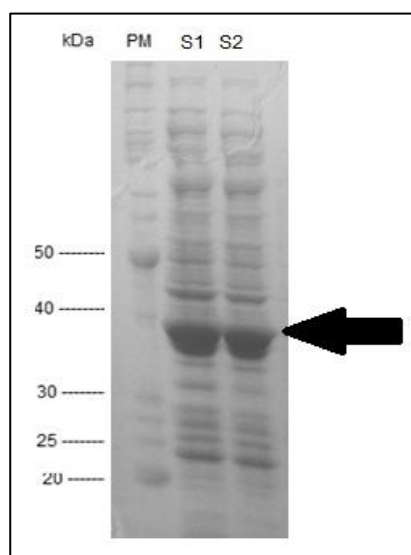


FIGURA 32 – ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DO CULTIVO DA *E. coli* BL21 RECOMBINANTE APÓS IMPULSOS DE SONICAÇÃO.

LEGENDA: PM – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, S1 E S2 – AMOSTRAS DA SONICAÇÃO DA BIOMASSA DO CULTIVO. FONTE: o autor (2014).

A concentração de proteína das amostras obtidas após os ciclos de sonicação da biomassa foram de 1.300 µg/mL e 1.100 µg/mL, respectivamente.

A purificação por cromatografia líquida de afinidade da fração clarificada em coluna de níquel está representada na FIGURA 33. A eletroforese em gel de SDS-PAGE demonstra as frações obtidas na fase de purificação.

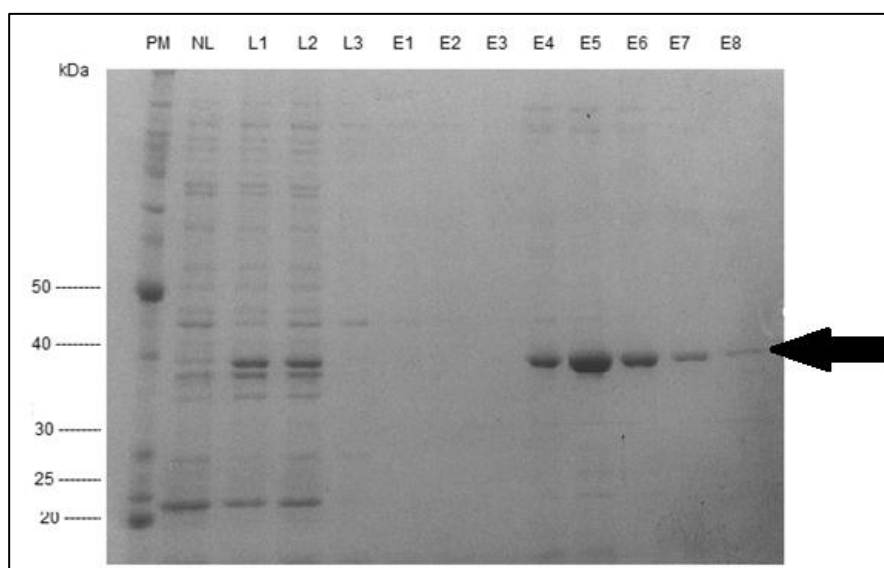


FIGURA 33 - ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EM COLUNA HIS Trap FF.

LEGENDA: PM - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; NL - AMOSTRA QUE DURANTE A INJEÇÃO NÃO SE LIGOU A COLUNA (NÃO-LIGADO); L1, L2, L3 -FRAÇÕES DE LAVAGEM DE COLUNA; E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 E E8 - ELUIÇÃO FRAÇÕES.

FONTE: o autor (2014).

A primeira fração, denominada NL, corresponde à fração “não ligada” a coluna, obtida no momento da injeção da amostra. As frações L1 e L2 são as alíquotas coletadas durante a lavagem da coluna com tampão de ligação. As frações E1 a E8 são as amostras coletadas da eluição da proteína da coluna (5 mL). As concentrações de proteína (µg/mL) foram de 538,64 e 618,44 para L1 e L2. As frações eluídas (E4 a E8) tiveram concentrações variáveis de 80,33 a 595,58 mg/mL (TABELA 10). As frações foram reunidas em um *pool*, e denominada proteína purificada com concentração final de 418 µg/mL.

TABELA 10 – FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE DO CULTIVO SONICADO EM TAMPÃO DE RESUSPENSÃO.

Frações do purificado	SONICADO	NL	L1	L2	E4	E5	E6	E7	E8
Concentração de proteínas (mg / L)	1.300,000	657,75	538,64	618,44	332,83	595,58	326,16	176,81	80,33

FONTE: o autor (2014).

Cada amostra possui 5 mL, a quantidade total de proteínas expressas por litro de cultivo foi de 3,483 mg. A expressão protéica foi eficiente, evidenciando uma concentração de 418 mg/L após o processo de purificação.

5.3.2 REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS COM TRITON X-114

As amostras pós-coluna apresentaram concentração de proteína de 380 mg/L após o processo para remoção de endotoxinas (LPS). A perda de proteína no processo de retirada de LPS foi de cerca de 9%. Essa amostra, livre de pirogênios, pode ser utilizada para os testes subsequentes de inoculação em animais e a verificação da imunogenicidade.

A expressão proteica e o processo de purificação se apresentaram eficientes. A concentração da fração clarificada (*pellet* do cultivo recombinante sonicado) foi de 1.300 mg/L. Levando-se em consideração que a concentração de proteína heteróloga expressa por *E. coli* é de aproximadamente 25% do total de proteína da biomassa (CHOIN *et al.*, 2006), a concentração de proteína expressa foi de 43,33 mg/L. A taxa de recuperação da proteína foi de 33%, com rendimento final de 348 mg/L, que está de acordo com a literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL E DA PROTEÍNA DE INTERESSE

5.4.1 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DO GENE CLONADO POR PCR INSERIDO NO PLASMÍDEO pAE

A sequência obtida do gene clonado por PCR inserido no plasmídeo pAE apresentou 1026 nucleotídeos. Quando comparado no geneBank com a base de dados BLAST (NCBI), resultou em 99 correspondências com 99% de identidade e E-valor de 0,0 para “*Corynebacterium diphtheriae* strain DIFT020 diphtheria toxin (tox) pseudogene, partial sequence” depósito no. V01536.1. Quanto menor o valor de E, ou quanto mais próximo estiver de zero, maior é a correspondência entre a sequência e a base de dados. O resultado foi de correspondência com a sequência B da toxina diftérica, do *Corinefago* beta. A sequência obtida pela análise está representada na TABELA 11.

TABELA 11– SEQUENCIA OBTIDA DO PLASMÍDEO COM O INSERTO.

```

AATGCATAAAATCTTGATTGGGATGTCATAAGGGATAAACTAAGACAAAGATAGAGTCT
TTGAAAGAGCATGGCCCTATCAAAAATAAAATGAGCGAAAGTCCCAATAAAACAGTATCT
GAGGAAAAAGCTAAACAATACCTAGAAGAATTTTCATCAAACGGCATTAGAGCATCCTGAA
TTGTCAGAACTTAAACCGTTACTGGGACCAATCCTGTATTTCGCTGGGGCTAACTATGCG
GCGTGGGCAGTAAACGTTGCGCAAGTTATCGATAGCGAAACAGCTGATAATTTGGAAAAG
ACAACCTGCTGCTCTTTGATACTTCCTGGTATCGGTAGCGTAATGGGCATTGCAGACGGT
GCCGTTCAACACAATACAGAAGAGATAGTGGCACAATCAATAGCTTTATCGTCTTTAATG
GTTGCTCAAGCTATTCCATTGGTAGGAGAGCTAGTTGATATTGGTTTCGCTGCATATAAT
TTTGTAGAGAGTATTATCAATTTATTTCAAGTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCGCG
TATTCTCCGGGGCATAAAACGCAACCATTTCTTCATGACGGGTATGCTGTCAGTTGGAAC
ACTGTTGAAGATTCGATAATCCGAACCTGGTTTTCAAGGGGAGAGTGGGCACGACATAAAA
ATTACTGCTGAAAATACCCCGCTTCCAATCGCGGGTGTCTACTACCGACTATTCTGGA
AAGCTGGACGTTAAT

```

5.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Os espectros MS/MS foram combinados e submetidos a buscas utilizando o programa Mascot. Esta análise identificou a sequencia obtida como a cadeia A, com a estrutura refinada da toxina diftérica em 2.3 angstroms de resolução, com base de

dados NCBI nr (número de acesso NCBI: gi576189), com *score* de 52, com massa molecular nominal (M_r) de 58304, *pI* calculado de 5,93 e taxonomia corinefago beta. A sequência da proteína teve correspondência com outras sequências descritas na TABELA 12.

TABELA 12 - CORRESPONDÊNCIAS DA SEQUÊNCIA OBTIDA NA ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

gi 576190	Corynephage beta
gi 1633500	Corynephage beta
gi 1633501	Corynephage beta
gi 2982136	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
gi 11513699	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
gi 11513700	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
gi 157830805	Corynephage beta
gi 157833808	Corynephage beta

FONTE: o autor (2014).

6 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento de uma vacina recombinante é importante definir as várias ferramentas como a estratégia de clonagem, de expressão, o processo de purificação, entre outros. No presente trabalho, o sistema de expressão foi escolhido visando utilizar um vetor não comercial para posterior produção do imunógeno industrialmente. A sequência do gene, contendo a informação da proteína da subunidade B da toxina diftérica foi clonada com o pareamento dos iniciadores desenhados especificamente para a realização do presente trabalho. Foram excluídos os 579 pb iniciais da sequência da toxina, por se tratar da porção que possui atividade tóxica. Ficou evidente o sucesso do desenho dos *primers* e do protocolo de clonagem por PCR. Esse resultado também foi confirmado pelo sequenciamento do plasmídeo contendo o inserto. A sequência clonada por PCR e inserida no plasmídeo teve 99% de similaridade à subunidade B da toxina diftérica (número de acesso NCBI: gi576189).

O vetor escolhido (pAE 2800 pb) foi desenvolvido a partir da união do vetor pET3-His (novagen, Madison, WI, EUA) com o sistema de expressão pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (RAMOS, 2004). O vetor pET resulta na expressão regulada e quando induzida, produz altos níveis de proteínas recombinantes. Contém o promotor T7 e gene de resistência a ampicilina, importante para a seleção das colônias transformadas e como agente de pressão para a manutenção do plasmídeo na célula hospedeira. Além disso, utiliza a origem de replicação de BR322DNA. Realiza a expressão com um *tag* de afinidade de 6 resíduos de histidina consecutivos (6XHis-tag) que permite a purificação por cromatografia de afinidade (RAMOS, 2004). Já o sistema de expressão pRSET codifica um peptídeo líder com os 12 primeiros aminoácidos do gene T7 e possui um *tag* de afinidade de 6 resíduos de histidina também. Possui um sítio de clivagem por enteroquinase localizado entre o peptídeo líder e o sítio de clonagem. Assim, a proteína recombinante e o *tag* de afinidade podem ser desconectados. Este aspecto é particularmente importante em proteínas imunologicamente ativas, pois há vários relatos na literatura de alterações conformacionais pela presença do *tag* de histidina (RAJ *et al.*, 2000; HARDER *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2008). A cauda de poli histidina também é interessante para a

confirmação da expressão da proteína recombinante por anticorpos monoclonais ou por reação enzimática.

A construção deste vetor foi realizada visando à expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* para a obter de grande quantidade de proteínas recombinantes. Este sistema possui a capacidade de produção de várias cópias do plasmídeo e a origem de replicação do DNA pUC19 que confere maior dose-efeito do DNA (SILVA, 2004; RAMOS, 2004). Pelas vantagens apresentadas pelo plasmídeo pAE, vários trabalhos utilizam-no para a produção de proteínas heterólogas (RAMOS, 2004; SILVA, 2005; GIL *et al.*, 2013). Silva, 2005 utilizou este vetor para produzir proteína recombinante de *Leptospira interrogans* em *E. coli* obtendo 10 – 12 mg/mL. Também GIL *et al.*, 2013 realizaram a clonagem da toxina butolínica utilizando o vetor pAE e o sistema de expressão de *E. coli*. Os autores desenvolveram um gene quimérico fusionando a subunidade B da toxina butolínica e o gene BoNT sorotipos C e D. Os resultados sugerem que a proteína obtida é forte candidata para a produção de uma vacina recombinante capaz de imunizar contra o butolismo.

A origem de replicação do vetor pAE é em *E. coli*. Este microrganismo possui seu metabolismo e genética bem conhecidos, sendo assim, muito utilizado para a expressão de proteínas heterólogas. A bactéria cresce rapidamente, sendo um cultivo barato para a produção de proteínas sob a forma de corpúsculos de inclusão, com alto rendimento. A produção de proteínas recombinantes em corpúsculos de inclusão promove o alto nível de acúmulo citoplasmático de proteína (cerca de 25% das proteínas totais) e podem ser isolados facilmente através de ruptura celular seguido de centrifugação simples diminuindo as etapas de *downstream* (CHOIN *et al.* 2006). As proteínas recombinantes produzidas geralmente encontram-se protegidas da ação de proteases. Estas características possibilitam sua utilização para a produção de diversas moléculas recombinantes (BANEYX, 1999; SCHUMANN, FERREIRA, 2004; JANA, DEB, 2005; CHOIN *et al.*, 2006). Porém, algumas dificuldades são encontradas no emprego desse microrganismo, como no processamento por tradução. Em proteínas imunogênicas, o correto dobramento da proteína (*folding*) está relacionado com suas propriedades antigênicas. A *E. coli* não realiza modificações pós-transcriniconais. Desta forma, é utilizada preferencialmente para a expressão de proteínas de origem bacteriana (WANG *et al.*, 2005). Outra desvantagem na utilização da *E. coli*, é a presença de endotoxinas (LPS), que possuem propriedades

pirogênicas em mamíferos. Para contornar essa desvantagem, após a produção da proteína recombinante, uma etapa de purificação para a remoção desses LPSs deve ser adicionada ao processo. Apesar das desvantagens esta célula hospedeira ainda é considerada um excelente sistema de clonagem (FERREIRA, 2004; TERPE, 2006). Um exemplo da utilização do sistema de expressão em *E. coli* foi o desenvolvimento de uma vacina recombinante para um novo vírus da gripe de H7N9, que circulou por toda a China em 2013. Para tal, a proteína recombinante de NP-M1-HSP60, uma fusão da nucleoproteína de matriz M1 da cepa A/PR/8/34 (H1N1) do vírus da gripe e o HSP60, foi clonada e expressa em *E. coli*. Esta proteína se apresenta uma candidata para o desenvolvimento de uma vacina contra a gripe H7N9 (YANG *et al.*, 2013)

Da mesma forma, genes que codificam proteínas de superfície de *Leptospira interrogans* Copenhageni preditas como potenciais ativos vacinais foram amplificados a partir do DNA genômico por PCR e clonados num sistema de expressão de *E. coli*. As proteínas recombinantes parcialmente purificadas foram testadas por Western-blot e dezesseis proteínas foram reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro humano podendo ser utilizada como proteínas imunogênicas ou em kits diagnósticos (GAMBERINI *et al.*, 2005).

As cepas de *E. coli* utilizadas neste trabalho (*E. coli* DH5alfa e BL21 DE3 pLysS), foram escolhidas pela capacidade de replicação do plasmídeo gerando múltiplas cópias e pela expressão de proteínas heterólogas em grande quantidade. A *E. coli* DH5alfa foi projetada para a clonagem e subclonagem. É capaz de aumentar a estabilidade de inserção e melhorar a qualidade do plasmídeo. Apresenta grande rendimento e qualidade na replicação de plasmídeo devido a mutação endA1. Possuem também estabilidade de inserção superior pela mutação recA1. Já a *E. coli* BL21 foi utilizada pela capacidade de expressão de grande quantidade de proteína heteróloga e pela regulação da expressão por IPTG. A presença do plasmídeo pLysS inibe a polimerase T7 que melhora o controle transcricional e reduz o vazamento de expressão (Invitrogen, 2014).

No presente trabalho ambas as estirpes apresentaram crescimento com a presença do inserto conforme verificado em gel de eletroforese (FIGURA 20), e mesmo após o cultivo e produção de banco celular, as cepas mantiveram o plasmídeo inserido quando testadas.

Vários trabalhos utilizam a BL21(DE3) pLysS, como sistema de expressão de proteínas (LI *et al.*, 2013; VRUSHABHENDRAPPA, 2014). LI *et al.*, 2013 que clonaram o gene pBD142 do peptídeo porcino b defensina 1, por sua atividade antimicrobiana. A sequência foi clonada por RT-PCR utilizando o sistema de expressão *E. coli* BL21(DE3) pLysS. A pBD142 recombinante apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e de *E. coli*, incluindo *E. coli* multi-resistentes. Vrushabhendrapa *et al.*, 2014 também utilizaram *E. coli* BL21 DE3 pLysS para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra. A região truncada de glucoquinase (r-gluc) do gene de *B. abortus* S19 foi clonada e expressa. Animais imunizados apresentaram proteção, sem sinais de necrose e vacuolização de tecido do fígado e baço.

Com relação à difteria e a vacina tríplice bacteriana, trabalhos vêm sendo desenvolvidos para o desenvolvimento de vacinas de subunidade (AMINIAN *et al.*, 2007; KHRUSTALEVA *et al.* 2015). AMINIAN *et al.*, 2007 desenvolveram a vacina contra tétano, difteria e coqueluche realizando a fusão de três antígenos vacinais: o fragmento C da toxina tetânica, a porção não-tóxica da toxina diftérica e a subunidade S1 da *pertussis*. O objetivo do trabalho foi produzir uma vacina com somente um processo de cultivo capaz de conferir imunidade às 3 doenças (AMINIAN *et al.*, 2007).

Na mesma linha de pesquisa, a sequência SF23, que corresponde ao peptídeo de ligação ao receptor celular da toxina diftérica (resíduos 508-530), foi sintetizado. O soro de pessoas infectadas com *C. diphtheriae* foi testado frente a proteína recombinante, resultando na interação dos anticorpos anti-difteria e a proteína SF23. Os autores mostraram que o fragmento proteico apresenta-se como potencial ativo vacinal contra *C. diphtheriae* (KHRUSTALEVA *et al.* 2015).

Como o objetivo fim do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma vacina recombinante de subunidade, algumas questões devem ser levadas em consideração. As vacinas de subunidades podem ser produzidas com proteínas, polissacarídeos ou conjugados de proteína-polissacarídeos. A tecnologia visa a apresentação de um antígeno ao sistema imune, sem partículas virais ou bacterianas não imunogênicas para a patologia em questão. Desta forma, utilizam uma proteína específica e isolada do patógeno ao qual se deseja conferir a imunidade. Ele pode conter um ou vários epítomos antigênicos do organismo patogênico. Uma desvantagem desta tecnologia é a possibilidade das proteínas isoladas desnaturar e,

consequentemente, induzir a produção de diferentes anticorpos, que não irão conferir imunidade frente ao patógeno. Porém, com a utilização de adjuvantes vacinais esta desvantagem pode ser minimizada (MORT, 2013). No mundo todo já se faz uso de vacinas de subunidades com resultados mais seguros, com a redução de efeitos colaterais e menor número de atendimentos decorrentes a vacinação (SCHATZMAYR, 2003).

As vacinas de subunidades já utilizadas nas campanhas mundiais são a hepatite B, a vacina *pertussis* acelular (aP) e a vacina da gripe. A vacina *pertussis* acelular contém a toxina *pertussis* inativada (proteína). A vacina é obtida pelo cultivo do patógeno. A toxina de *pertussis* é detoxificada por processo químico (formaldeído) e purificada. Algumas vacinas desenvolvidas mais recentemente, já fazem a utilização de técnicas de genética molecular, transformando a molécula da toxina em um epítipo não tóxico, tal qual ocorre com as vacinas para gripe e da hepatite B (MORT, 2013).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando a toxina diftérica, suas subunidades ou mutantes como foco na produção de proteínas imunogênicas (LEONG *et al.*, 1983; ZDANOVSKY AG *et al.*, 1992; JOHNSON N *et al.*, 1997; LOBECK K, *et al.*, 1998). Outras várias tentativas foram realizadas visando desenvolver uma vacina de subunidade recombinante para a difteria, capaz de conferir imunidade duradoura e com menor incidência de efeitos colaterais. Porém, ainda não existe no mercado mundial uma vacina recombinante para difteria (LEONG *et al.*, 1983; ZDANOVSKY AG *et al.*, 1992; JOHNSON N *et al.*, 1997; LOBECK K, *et al.*, 1998).

Para tal, a clonagem do fragmento A da toxina diftérica em *E. coli* K12 foi realizada, visando suas propriedades imunológicas. LEONG *et al.*, 1983 realizaram a transfecção do gene codificador da toxina em *E. coli*, visando a produção da proteína para a utilização como potencial. Em outros trabalhos, a subunidade B da toxina diftérica foi conjugada com epítopos meningocócicos como vacina para a toxina diftérica e meningite (JOHNSON *et al.*, 1997). A expressão de fragmentos da toxina diftérica, do domínio de ligação ao receptor (DT 382-535) e um peptídeo linear (DT 168-220) do fragmento entre a subunidade A e B, foi realizada visando a obtenção de vacina de subunidade (LOBECK K, *et al.*, 1998).

Miyagi *et al.* (2001) que expressaram a toxina diftérica mutante em *Mycobacterium*, com o gene CRM 197 com objetivo imunogênico. Abulmagd *et al.* (2013) realizaram a inserção dos fragmentos A e B da toxina do *C. diphtheriae* para o desenvolvimento de toxina recombinante.

No presente trabalho, a expressão e purificação da proteína correspondente à subunidade B da toxina diftérica foram realizadas com sucesso, conforme pode se verificar nas figuras 22 a 34 onde são constatadas uma proteína de 37kDa. A proteína foi expressa em fusão com 6xHis para possibilitar a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A concentração de proteína expressa foi de 43,33 mg/L com taxa de recuperação da proteína de 33% e rendimento final de 348 mg/L que está de acordo com a literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Nascimento *et al.* (2010) expressaram a subunidade B da toxina recombinante em *E. coli* obtendo níveis elevados de proteína. Obtiveram rendimento de 380 mg/L, similar ao presente trabalho, porém grande parte das proteínas expressas, estavam na forma insolúvel, segundo os autores, provavelmente pela expressão em corpúsculos de inclusão. No entanto, no presente estudo, pela utilização da ureia em todos os tampões, a proteína se manteve solúvel durante todo o processo.

A subunidade B da toxina diftérica é capaz de interagir com a membrana celular via receptores e realiza a internalização de moléculas para o citoplasma celular. Estas características fazem com que seja muito visada como carreadora de drogas. Moléculas grandes, ou com dificuldade de permeação da membrana são conjugadas com a subunidade B para facilitar o aporte das mesmas para as células. Um mutante não tóxico da toxina da difteria (CRM 197) é uma proteína veículo muito utilizada, principalmente em vacinas. Por mais de uma década, várias vacinas glicoconjugadas com a CRM 197 foram amplamente utilizada contra doenças graves, incluindo *Haemophilus influenzae* tipo b e doença pneumocócica. A CRM 197 possui outras aplicações como na quimioterapia conjugada com moléculas antineoplásicas (BRÖKER *et al* 2011).

Dentro desta mesma utilização, Urieto *et al.*, 2004 descrevem a expressão da toxina diftérica recombinante marcada para leucemia mielóide aguda, obtendo cerca de 25 mg/L da proteína de interesse após etapa de purificação.

Também pelas características acima descritas da subunidade B, existe a utilização da mesma como sistema permeador de drogas na barreira

hematoencefálica. Fragmentos da toxina diftérica ligada à célula T foram clonadas visando a permeação celular, devido a grande capacidade de permeação da toxina diftérica em quase todas as células eucariotas (COLOMBATT *et al.*, 1986; CHEN, LIU. 2012).

Desta forma, a proteína clonada e expressa possui uma infinidade de aplicações devido as suas características imunogênicas e de transporte de moléculas através da membrana celular, podendo ser posteriormente exploradas.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, produziu-se uma proteína heteróloga, com concentração de 418 µg/mL, com potencial imunogênico contra *C. diphtheriae*. Esta proteína é uma alternativa viável industrialmente para a produção de vacina de subunidade recombinante contra difteria, por utilizar um vetor de expressão não comercial (pAE).

- a) *C. diphtheriae* foi cultivado em frascos Erlemeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo, durante 72 h, 180 rpm e a 37°C, e produziu biomassa para a extração do DNA (270 ng/uL).
- b) O gel de agarose do produto de clonagem da subunidade B da toxina diftérica apresentou banda correspondente a sequência de interesse (1046 pb) e a concentração do DNA obtida após purificação foi de 250 ng/µL.
- c) O produto da PCR e o plasmídeo pAE após reação de ligação, foram transfectados em *E. coli*. A eficácia da ligação ficou evidente no gel de agarose da dupla digestão do plasmídeo ligado ao inserto, com a liberação do inserto (banda próxima a 1.000 pb).
- d) A célula hospedeira (*E. coli* BL21) se mostrou capaz de expressar satisfatoriamente a proteína recombinante de interesse.
- e) O método de purificação da proteína recombinante por cromatografia líquida de afinidade com coluna de níquel demonstrou ser um ótimo método para a purificação. Foi obtida uma amostra com alta pureza de proteína recombinante e com a recuperação de uma média de 418 µg/mL.
- f) As melhores condições de expressão da proteína recombinante foram 31°C, 0,5 mM de indutor (IPTG) e 3 horas de indução.
- g) A remoção de endotoxinas na amostra de proteína recombinante purificada foi realizada, sem grandes perdas da proteína durante o processo (380 µg/mL), com recuperação de 33%.
- h) A confirmação da identidade do inserto por sequenciamento do plasmídeo ligado ao inserto também deu positiva, com 99% de similaridade a subunidade B da toxina diftérica.
- i) A identidade da proteína foi confirmada por SDS PAGE (banda próxima a 37 kDa) e por MALDI-TOF.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo do presente trabalho foi a expressão da proteína recombinante. O objetivo foi alcançado com similaridade de 99% com a subunidade B da toxina diftérica. Porém, ainda é necessária a verificação da imunogenicidade em testes *in vivo*, para confirmar seu potencial como vacina, sendo desta forma uma proteína imunologicamente ativa, capaz de conferir anticorpos de proteção contra o *C. diphtheriae*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH W, SCHEIDT V, UTHMAN S, STARK MJR, SCHAFFRATH R. **Insights into diphthamide, key diphtheria toxin effector.** *Toxins*, 5(5), 958–68. doi:10.3390/toxins5050958, 2013.
- ABULMAGD S, EMARA M, AZIZ S, EL-DOMANY R **Evaluation and characterization of A and B fragments of *Corynebacterium diphtheriae* toxin towards recombinant diphtheria vaccine** *Indian Journal of Medical Microbiology* 31 3-9 DOI: 10.4103/0255-0857.108702 PMID: 23508421, 2013.
- AIDA, Y.; PABST, M.J. **Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114.** *Journal of Immunological Methods*, v. 132, p. 191-195, 1990.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science Publishing, 2002.
- AMINIAN, M.; SIVAM, S.; LEE, C.W.; HALPERIN, S.A.; LEE, S.F. **Expression and purification of a trivalent pertussis toxin–diphtheria toxin–tetanus toxin fusion protein in *Escherichia coli***, *Protein Expression and Purification*, Volume 51, Issue 2, February 2007, Pages 170-178, ISSN 1046-5928
- BANEYX, F. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli***. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Amsterdam, v.10, p.411-421, 1999.
- BONNET JM, BEGG NT **Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control.** *Commun Dis Public Health* http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947407702. Acessado em 29 Setembro 2013, 1999.
- BONZINO JD, BIZZINI B **Tissue engineering and artificial organs – The Biomedical engineering Handbook**, Taylor & Francis Corp. CRC Press 3º ed Boca Raton, FL ISBN 0-8493-2123-9, 2006.
- BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Ministério da Saúde. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1480-8, 2008.

BRASIL Ministério da Saúde, Brazil – **Vacinação**
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/51vacinacao.html> Acessado em 15 de novembro de 2013, 2013.

BRADFORD M M **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 72:248-254, 1999.

BRODER K R **Preventing Tetanus, Diphtheria, and Pertussis Among Adolescents: Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid and Acellular Pertussis Vaccines - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)** – CDC
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr55e223a1.htm> Acessado em 20 de Setembro de 2013, 2006.

BRÖKER, M.; COSTANTINO, P.; DETORA, L.; MCINTOSH, E. D.; RAPPUOLI, R. **Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 (CRM197), a non-toxic mutant of diphtheria toxin: Use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications,** Biologicals, Volume 39, Issue 4, July 2011, Pages 195-204, ISSN 1045-1056, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.05.004>.

BUZZI S, RUBBOLI D, BUZZI G, BUZZI AM, MORISI C, PIRONI F **CRM 197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients.** Cancer Immunol Immunother 53:1041-1048 DOI 10.1007/s00262-004-0546-4, 2004.

BYARD RW **Diphtheria ‘The strangling angel’ of children,** Journal of Forensic and Legal Medicine, 20(2):65-68, ISSN 1752-928X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.006>, 2013.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. **Summary of notifiable diseases: United States,** 2002. MMWR 2004;51(53):1-84.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. **Fatal respiratory diphtheria in a U.S.traveler to Haiti:** 2004. MMWR 2004;52(53):1285-6.

CDC - **Composition of selected vaccines with tetanus toxoid, diphtheria toxoid, and acellular pertussis components licensed in the United States.** 2006 <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr55e223a2.htm>. Acessado em 15 de Novembro de 2013.

CDC - **Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis (Tdap) vaccine** from the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR 60(1): 13-15. 2011
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6001a4.htm> Acessado em 10 de Novembro de 2013.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 6 – Diphtheria.** Atkinson W, Hamborsky J, Wolfe S, eds. 12th ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2012.

CHEN Y, LIU L (2011) **Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier**, Advanced Drug Delivery Reviews. 64 (7) 640-665, ISSN 0169-409X
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>.

CHEN RT, BROOME CV, WEINSTEIN RT **Diphtheria in the United States, 1971-1981.** Am J Publ Health 1985;75:1393-7. DM, September 2007 433

CHRISTENSON B, HELLSTRÖM U, SYLVAN SPE, HENRIKSSON L, GRANSTRÖM M **Impact of a vaccination campaign on adult immunity to diphtheria**, Vaccine 19(9-10) 1133-1140, ISSN 0264-410X, [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00315-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00315-7), 2000.

CHOIN HJ, KEUM KC, LEE SY **Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*.** Chemical Engineering Science 61:876-885, 2006.

CIEPLAKS W, GAUDIN MH, EIDELS L **Diphtheria Toxin Receptor. Identification of specific diphtheria toxin-binding proteins on the surface of vero and bs-c-1 cells.** The journal of biological chemistry 262: 27 1324613253. Available in: <http://www.jbc.org/content/262/27/13246.full.pdf>, 1987.

EDGAR H. RELYVELD, BERNARD BIZZINI, RAJESH K. GUPTA **Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids**, Vaccine 16:1016-1023, ISSN 0264-410X, [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00288-0)., 1998.

FERREIRA T., RASBAND, W. **ImageJ User Guide** IJ 1.46r. Disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf> acessado em 05/10/2014, 2012.

FDA - Vaccines, Blood & Biologics

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm093830.htm> Acessado em 20 de Novembro de 2013, 2013.

FRANÇOIS, B **Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli***. Curr.Opin. Biotechnology, v. 10, p. 411-421, 1999.

FREDLUND H, NORÉN T, LEPP T, MORFELDT E, HENRIQUES NORMARK B. **A case of diphtheria in Sweden**, October 2011. Euro Surveill. 16(50):pii=20038. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20038>, 2011.

GALAZKA AM, ROBERTSON SE (1996) **Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults**. Vaccine 14: 845-857.

GAMBERINI, M.; GÓMEZ, R.M.; ATZINGEN, M. V., MARTINS, E.A.; VASCONCELLOS, S.A.; ROMERO, E.C.; LEITE, L.C.; HO, P.L.; NASCIMENTO, A.L. **Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis**. FEMS Microbiol Lett. 2005 Mar 15;244(2):305-13.

GHOLIPOUR, A. MOOSAVIAN, A., GALEHDARI, H., MAKVANDI, M., MEMARI H.R., ALVANDI, A. **Cloning and periplasmic expression of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) protein of *Legionella pneumophila* in *Escherichia coli***. Jundishapur Journal of Microbiology 3:1-9, 2010.

GIL L.A.F.; CUNHA C.E.P.D.; MOREIRA G.M.S.G.; SALVARANI F.M.; ASSIS R.A.; LOBATO, F. C. F.; MENDONÇA, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; CONCEIÇÃO, F. R. **Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D**. PLoS ONE 8(7): e69692. doi:10.1371/journal.pone.0069692, 2013.

GÓMEZ-DUARTE O, GALEN J, CHATFIELD SN, RAPPUOLI R, EIELDS L, LEVINE MM **Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain** Vaccine Vol 13 n16 1596-1602, 1995.

GOPAL G. J., KUMAR A. **Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*** Protein J (2013) 32:419–425 DOI 10.1007/s10930-013-9502-5.

GROMAN NB **Evidence for the active role of bacteriophage in the conversion of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* to toxin production.** Journal of. Bacteriology 69(1):9. <http://jb.asm.org/content/69/1/9.full.pdf>. Acessado em 14 de Setembro de 2013, 1955.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRODER, J.M. **Isolation and characterization of human b-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic**, J. Biol. Chem. 276 (2001) 5707–5713.

HANDYSIDES S **Woman from England acquired diphtheria on a Baltic cruise.** Euro Surveill. 1997;1(7):pii=1094. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1094> Acessado em 12 de Dezembro de 2013, 2013.

HARNISCH JP, TRONCA E, NOLAN CM **Diphtheria among alcoholic urban adults.**Ann Intern Med 1989;111:71-82.

HEINEMANN, P G **Note on the Concentration of Diphtheria Toxin** J. Biol. Chem.5:27-30, 1908.

HUANG, L.; CHING, C.B.; JIANG, R.; LEONG, S.S. **Production of bioactive human-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression, Protein.** Exp. Purif. 61 (2008) 168–174.

INVITROGEN, 2014 Disponível em: http://openwetware.org/images/d/df/Subcloning_Efficiency_DH5a_Chemically_competent_E._Coli.pdf; acessado em 22/10/2014.

JANA, S.; DEB, J. K. **Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*.** Appl. Microbiol. Biotechnol., Nova York, v.67. p.289-298, 2005.

JOHNSON N, PICKETT MA, WATT PJ, CLARKE IN, HECKELS JE **Construction of an epitope vector utilising the diphtheria toxin B-subunit**, FEMS Microbiology Letters 146 (1) 91-96, ISSN 0378-1097, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00459-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00459-4), 1997.

KABERNIUK AA, OLIŇNYK OS, KOLYBO DV, KOMISARENKO SV **Toxin-neutralizing properties of antibodies to diphtheria toxin recombinant subunits A**

and B and a new method of their estimation. Ukr Biokhim Zh. 81(3):92-101. PMID:19877434, 2009.

KARAKUS R, CAGLAR K, AYBAY C. **Evaluation of human antibody responses to diphtheria toxin subunits A and B in various age groups.** Clinical Microbiology and Infection, 13:1065–1071. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01804.x, 2007.

KIM, S. Y.; SEO, J. H.; CHA, H. J. **Enhancement of heterologous proteins expression in *Escherichia coli* by co-expression of nonspecific DNA-binding stress protein,** Dps. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 460-465, 2003.

KHETSURIANI N, ZAKIKHANY K, JABIROV S, SAPAROVA N, URSU P, WANNEMUEHLER K, WASSILAK S, EFSTRATIOU A, MARTIN R **Seroepidemiology of diphtheria and tetanus among children and young adults in Tajikistan: Nationwide population-based survey,** 2010, Vaccine, 31(42):4917-4922 ISSN 0264-410X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.015>.

KHRUSTALEVA, T.A.; KHRUSTALEV, V. V.; BARKOVSKY, E.V.; KOLODKINA, V. L.; ASTAPOV, A. A. **Structural and antigenic features of the synthetic SF23 peptide corresponding to the receptor binding fragment of diphtheria toxin,** Molecular Immunology, Volume 63, Issue 2, February 2015, Pages 235-244, ISSN 0161-5890, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.07.008>.

KONEMAN E W, ALLEN S D, SCHRECKENBERGER P C, WINN J W C **Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido.** 5.ed. São Paulo: Medsi, 2001.

KRUMINA A, LOGINA I, DONAGHY M, ROZENTALE B, KRAVALE I, GRISKEVICA A, VIKSNA L **Diphtheria with polyneuropathy in a closed community despite receiving recent booster vaccination** J Neurol Neurosurg Psychiatry 76:1555-1557 doi:10.1136/jnnp.2004.056523, 2005.

LAMPIDIS T, BARKSDALE L. **Park-Williams number 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae*.** J Bacteriol.1971 Jan;105(1):77–85

LAVAL E **El garrotilho (Difteria) en España (Siglos XVI y XVII)** Revista chilena de infectología 23 doi:10.4067/S0716-10182006000100012, 2006.

LEE CW, LEE SF, HALPERIN SA **Expression and Immunogenicity of a Recombinant Diphtheria Toxin Fragment A in *Streptococcus gordonii*** Appl

Environ Microbiol. 70(8): 4569–4574 doi: 10.1128/AEM.70.8.4569-4574.2004PMCID: PMC492408, 2004.

LEMMENS, R.; OLSSON,U.; NYHAMMAR, T.; STADLER, J.; **Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption**, Journal of Chromatography B, Volume 784, Issue 2, 5 February 2003, Pages 291-300, ISSN 1570-0232, [http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00805-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00805-X).

LI, C.; ZHAO, W.; ZHENG, Z.; XU, T.; CHEN, R.; HUANG, X.; ZHAO, Y.; BAO, Y. **Cloning, expression and characterization of antimicrobial porcine defensin 1 in *Escherichia coli***, Protein Expression and Purification 88 (2013) 47–53

LILJEQVIST S, STÅHL S **Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines**. Journal of Biotechnology 73 (1) 1-33, ISSN 0168-1656, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00107-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00107-8), 1999.

LINDHUSEN-LINDHÉ E, DOTEVALL L, BERGLUND M. **Imported laryngeal and cutaneous diphtheria in tourists returning from western Africa to Sweden**, March 2012. Euro Surveill.2012;17(23):pii=20189.<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20189>. Acessado em 26 de Dezembro de 2013.

LOBECK K, DREVET P, LE'ONETTI M, FROMEN-ROMANO C, DUCANCEL F, LAJEUNESSE E, LEMAIRE C, MÉNEZ A **Towards a Recombinant Vaccine against Diphtheria Toxin** Infection and Immunity, 66:418–423 No. 2 0019-9567/98/\$04.0010, 1998.

LUMIO J, SUOMALAINEN P, OLANDER R-M **Fatal case of diphtheria in an unvaccinated infant in Finland**. Pediatr Infect Dis J 2003;22(9):844-6.

MAPLE, P.A.C.; JONES, C. S.; EDMUNDS, W. J.; ANDREWS, N.J.; WALL, E. C. MILLER, E. ; VYSE, A. **Immunity to diphtheria and tetanus in England and Wales**, Vaccine 19, 167±173, 2001.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; MOREIRA, L. O.; DAMASCO, P. V., HIRATA JUNIOR, R. **Diphtheria remains a threat to health in the developing world: an overview**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003, vol.98, n.8, pp. 987-993. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000800001>.

MIYAJI EN, MAZZANTINI RP, DIAS WO, NASCIMENTO AL, MARCOVISTZ R, MATOS DS, RAW I, WINTER N, GICQUEL B, RAPPUOLI R, LEITE LC. **Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM (197), a mutant diphtheria toxin.** Infect Immun 69:869-74 PMID:11159980, 2001.

MMWR **Updated Recommendations for Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid and Acellular Pertussis (Tdap) Vaccine** from the Advisory Committee on Immunization 2010 Practices <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6001a4.htm> Acessado em 24 de Novembro de 2013.

MORT M **Vaccine Safety Basics – Subunit Vaccine (purified antigen) 2013** <http://www.vaccine-safety-training.org/subunit-vaccines.html> Acessado em 24 de Novembro de 2013.

MUELLER JH, MILLER PA **Production of Diphtheric Toxin of High Potency (100 Lf) on a Reproducible Medium** J Immunol 40:21-32, 1941.

MURBY, M.; UHLEN, M.; STAHL, S. **Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in Escherichia coli.** Protein Expression and Purification, v. 7(2), p. 129-136, 1996.

MURPHY JR Chapter 32 - **Corynebacterium Diphtheriae** In: Baron S, editor Medical Microbiology. 4th edition, Galveston (TX) University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

NASCIMENTO DV, LEMES EMB, QUEIROZ JLS, SILVA JG JR., NASCIMENTO HJ, SILVA ED, HIRATA R JR., DIAS AASO, SANTOS CS, PEREIRA GMB, MATTOS-GUARALDI AL, GRG ARMOA **Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 Corynebacterium diphtheriae strain toxin** Braz J Med Biol Res 43(5) 460-466, 2010.

OHUABUNWO C, PEREVOSCIKOV S, GRISKEVICA A, GARGIULLO P, BRILLA A, VIKSNA L, GLISMANN S, WHARTON M, VITEK C **Respiratory diphtheria among highly vaccinated military trainees in Latvia: improved protection from DT compared with Td booster vaccination.** Scand J Infect Dis 37: 813-820. PMID:16308214, 2005.

PAHO **American Health Organization. Health Analysis and Information. Based on United Nations World Population Prospects** revision 2012.

<http://www1.paho.org/English/SHA/coredata/tabulator/newsqITabulador.asp>.
Acessado em 10 de Janeiro de 2014.

PAPPENHEIMER AM JR **Diphtheria toxin**. Ann Rev Biochem 46:69 PMID:20040, 1977.

PAPPENHEIMER AM JR.T PAPPENHEIMER AM **The diphtheria bacillus and its toxin: a model system**. J. Hyg., Camb. 93:397-404 PMCID: PMC2129457, 1984.

PERAINO JS , SCHENK M, LI G, ZHANG H, FARKASH EA, SACHS DH, HUANG CA, DURAN-STRUUCK R, WANG Z **Development of a diphtheria toxin-based recombinant porcine IL-2 fusion toxin for depleting porcine CD25+ cells**, Journal of Immunological Methods 398–399:33-43, ISSN 0022-1759, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2013.09.006>, 2013.

PERKINS S, CORDERY R, NIXON G, ABRAHAMS A, ANDREWS J, WHITE J, EFSTRATIOU A, ANARAKI S **Investigations and control measures following a non-travel-associated case of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae***, Euro Surveill. 2010;15(16):pii=19544. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19544> Acessado em 2 de Janeiro de 2014.

QUEIROZ T N, BISINOTTO F M B, SILVA T M M, MARTINS L B **Anesthesia for cesarean section in pregnant woman with Guillain Barré syndrome: a case report**, Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition), Volume 64, Issue 5, September–October 2014, Pages 369-372, ISSN 0104-0014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjane>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S010400141300198X>)

RAJ, P.A.; ANTONYRAJ, K.J.; KARUNAKARAN, T. **Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins**, Biochem. J. 347 (2000) 633–641.

RANDALL R K **Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene**. J Infect Dis. 181(1):S156-67. PMID:10657208, 2000.

RAPPUOLI R, BLACK S, LAMBERT PH **New Decade of Vaccines 2 Vaccine discovery and translation of new vaccine technology** Lancet 378: 360–68 DOI:10.1016/S0140-6736(11)60440-6, 2011.

RAPPUOLI, R., PODDA T A., GIOVANNONIT F., NENCIONI L., PERAGALLOT M.; FRANCOLINI P. **Absence of protective immunity against diphtheria in a large proportion of young adults** 576 Vaccine, Vol. 11, Issue 5, 1993.

RAPPUOLI R, PERUGINI M, FALSEN E. **Molecular epidemiology of the 1984-1986 outbreak of diphtheria in Sweden.** N Engl J Med 1988;318(1):12-4.

ROMANIUK SI, KOLIBO DB, KOMISARENKO SV, **Perspectives of application of recombinant diphtheria toxin derivatives.**Bioorg Khim. 38(6):639-52. PMID: 23547467, 2012.

ROUSSEAU C, BELCHIOR E, BROCHE B, BADELL E, GUIZO N, LAHARIE I, LEVY-BRUHL D **Diphtheria in the south of France, March 2011.**Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles.European communicable disease bulletin, 16(19), 5–7, 2011.

SAMBROOK J, RUSSEL D W **Molecular Cloning.**3rd edition.3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHATZMAYR H G **Novas perspectivas em vacinas virais.***História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 10(Supl. 2), 655-669, disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702003000500010&lng=en&tlng=pt. 10.1590/S0104-59702003000500010, 2003.

SILVA, M Clonagem, Expressão e Purificação das proteínas de Superfície, PsaA e Fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*: 2000-2005. 149f Tese (Doutorado em biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia: USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

SLONCZEWSKI JL, FOSTER JW **Microbiology: An Evolving Science**, Second Edition,2010.
http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/img/eTopics/sfmb2e_eTopic_2502_3.jpg Acessado em 02 de Janeiro de 2014.

SMITH PB **Public Health Image Library** - Photographs, Illustrations, Multimedia. <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>, 1973 Acessado em 10 de Dezembro de 2013.

STEFAN A, CONTI M, RUBBOLI D, RAVAGLI L, PRESTA E **Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*.** J. Biotechnol. 156 (4): 245-52, 2010.

SHEVCHENKO A, JENSEN ON, PODTELEJNIKOV AV, SAGLIOCCO F, WILM M, VORM O, MORTENSEN P, SHEVCHENKO A, BOUCHERIE H, MANN M, **Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14440-5

SCHULMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. **Production of recombinante proteins in *Escherichia coli*.** *Gen. Mol. Bio.*, São Paulo, v. 27, p. 442-453, 2004.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211-222, 2006.

TODAR **Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology "The Good, the Bad, and the Deadly"** .2010 http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html. Acessado em 10 de setembro de 2013.

URIETO JO, LIU TF, BLACK JH, COHEN KA, HALL PD, WILLINGHAM MC, PENNELL LK, HOGGE DE, KREITMAN RJ, FRANKEL AE **Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT₃₈₈IL3 for phase I clinical trials.** *Protein Expr Purif.*33: 123-133.2003 PMID:14680969

URIETO J.O., LIU T., BLACK J.H., COHEN K.A., HALL P.D., WILLINGHAM M.C., PENNELL LK, HOGGE D.E., KREITMAN R.J., FRANKEL A.E. Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL3 for phase I clinical trials *Protein Expr Purif.* 2004 Jan;33(1):123-33.

VRUSHABHENDRAPPA; SINGH, A.K.; BALAKRISHNA, K.; HARISHCHANDRA, M.; SRIPATHY; BATRA, H.V. **Studies on recombinant glucokinase (r-glucokinase) protein of *Brucella abortus* as a candidate vaccine molecule for brucellosis,** *Vaccine*, Volume 32, Issue 43, 29 September 2014, Pages 5600-5606, ISSN 0264-410X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.106>

VIS **Vaccine** **Information** **Statements** **CDC** 2007
<http://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/td-tdap.html>. Acessado em 04 Novembro de 2013 W.W. Norton & Company, New York NY. ISBN: 978-0-393-93447-2
http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/img/eTopics/sfmb2e_eTopic_2502_3.jpg Acessado em 10 de Janeiro de 2014.

YANG, P.; WANG, W.; GU, H.; LI, H.; ZHANG, K.; WANG, Z.; LI, R.; DUAN, Y.; ZHANG, S.; WANG, X.; **Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NP-M1-HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice**, Antiviral Research, Volume 111, November 2014, Pages 1-7, ISSN 0166-3542, <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.008>.

YOON D, CHU DSH, NG CW, PHAM EA, MASON AB, HUDSON DM, SMITH VC, MACGILLIVRAY RT, KAMEI DT **Genetically engineering transferrin to improve its in vitro ability to deliver cytotoxins**, Journal of Controlled Release 133(3):178-184, 2009. ISSN 0168-3659, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.006>.

WANG, F.; LIU, Y.; CHEN, J.; SU, Z. **Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control**. China Particuol., Pequín, v.3, p. 337-342, 2005.

WEISBERG, S.S. **Diphtheria** Dis Mon 2007;53:430-434 0011-5029/2007 doi:10.1016/j.disamonth.2007.

WHO **The immunological basis for immunization series module 2: diphtheria. Geneva: World Health Organization, 1993. WHO/EPI/GEN/93.12.** <http://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/4-diphtheria-v2.pdf> Acessado em 23 de Novembro de 2013.

WHO - **Weekly epidemiological record**.2006 <http://www.who.int/wer/2006/wer8103.pdf>. Acessado em 28 de Dezembro de 2013.
WHO (2013) - Subunit vaccines. <http://www.vaccine-safety-training.org/subunit-vaccines.html> Acessado em 10 de Dezembro de 2013.

ZDANOVSKY AG, KULAEVA OI, YANKOVSKY NK **Construction and expression of diphtheria toxin-encoding gene derivatives in Escherichia coli**.Gene 116:81-86 1996. ISSN 0378-1119 [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90632-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(92)90632-Y).